



Raquel Beirão Antunes

Licenciatura em Biologia Celular e Biotecnologia

**Avaliação do efeito da digestão *in vitro* na
capacidade antioxidante de infusões medicinais:
Flor de Camomila e Flor de Laranjeira.**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professora Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando

Arguente: Professor Doutor António Sebastião Rodrigues

Vogal: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2012



Raquel Beirão Antunes

Licenciatura em Biologia Celular e Biotecnologia

**Avaliação do efeito da digestão *in vitro* na
capacidade antioxidante de infusões medicinais:
Flor de Camomila e Flor de Laranjeira.**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professora Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando

Arguente: Professor Doutor António Sebastião Rodrigues

Vogal: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



Setembro 2012

Direitos de Cópia/Copyright – Raquel Beirão Antunes, FCT/UNL e UNL

“Avaliação do efeito da digestão in vitro na capacidade antioxidante de infusões medicinais: Flor de Camomila e Flor de Laranjeira”, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Terminado que está este trabalho, não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que, directa ou indirectamente, contribuíram para a sua elaboração e conclusão, tendo sido a sua colaboração e apoio imprescindíveis.

Agradeço à Professora Doutora Benilde Mendes, coordenadora do Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar, pelo seu profissionalismo e pela simpatia com que sempre nos recebeu.

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Paula Duarte, por me ter proposto este desafio, pela grande orientação e disponibilidade para todas as dúvidas e crises, por conseguir sempre encontrar as melhores soluções para os problemas, pelo apoio, conselhos científicos e profissionais, expressando também a minha admiração pelo seu esforço em proporcionar sempre as melhores condições materiais e humanas possíveis para o desenvolvimento do trabalho experimental.

À minha colega de trabalho, Marta Borges, uma parte tão importante no trabalho laboratorial, partilhando resultados bons e maus, agradeço pela sua boa disposição, ajuda e presença amiga constante em todos os momentos.

A todos os frequentadores assíduos do laboratório 145 pelo bom acolhimento, nomeadamente à Sara, sempre com um bom humor contagiante, à D. Rita e à D. Rosa, que nos prestaram o melhor auxílio possível.

Aos meus Pais e Irmã, pelo apoio, carinho e compreensão demonstrados, não só agora como ao longo de todos estes anos, por acreditarem em mim, me fazerem pensar com mais calma e ponderação e terem-me permitido a constante procura de novos horizontes na minha vida.

Aos meus amigos, pela sua paciência e amizade incondicional, presença animadora e encorajadora, por me levantarem sempre que me deixo ir abaixo.

E finalmente ao grupinho do Monte, Rita Faria, André Monho, Hugo Pereira, Hugo Ramos, Maria Oliveira, Ana Maria Oliveira e Ricardo Vieira, pelos dias e noites incansáveis de trabalho e diversão, por terem sido a minha “casa” neste pouco mas bom tempo que passámos juntos.

Resumo

Diversos trabalhos têm vindo a demonstrar, através de ensaios *in vitro*, que as infusões de plantas medicinais possuem elevado potencial antioxidante. Contudo, para que esse potencial se mantenha nas condições fisiológicas é necessário, entre outras condições, que os compostos por ele responsáveis resistam à digestão gastrointestinal. Este trabalho teve por objectivo a determinação da capacidade antioxidante e a quantificação dos compostos fenólicos de duas infusões de consumo corrente em Portugal, flor de camomila (*Matricaria chamomilla* L.) e flor de laranjeira-azeda (*Citrus aurantium*), antes e após serem submetidas a uma simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal. Para todas as amostras foi avaliado o poder de quelação férrica, a capacidade redutora do cobre (pelo ensaio CUPRAC), a capacidade de sequestro dos radicais anião superóxido e hidroxilo e a quantificação em compostos fenólicos e flavonóides totais.

No caso da infusão de laranjeira, a simulação *in vitro* da digestão não alterou o teor em compostos fenólicos, levou a uma redução de cerca de 17% do teor em flavonóides e de 8% do valor de CUPRAC, não tendo qualquer efeito sobre o sequestro do radical anião superóxido. No caso da infusão de camomila, a simulação da digestão levou à redução em cerca de 83% do valor de flavonóides e de 28% do sequestro do radical anião superóxido. Nos ensaios de sequestro do radical hidroxilo e de quelação de Fe (II) não foi possível tirar conclusões devido à interferência das enzimas digestivas com as técnicas analíticas.

Os resultados obtidos permitem concluir que, apesar das diferenças observadas antes e após a simulação da digestão gastrointestinal, a maioria dos compostos responsáveis pelo potencial antioxidante das infusões de flor de camomila e laranjeira não perde a sua actividade durante o processo digestivo, uma vez que ambas as infusões possuem capacidade antioxidante após terem sofrido digestão gastrointestinal *in vitro*.

Palavras-Chave: Infusões medicinais, flor de camomila, flor de laranjeira-azeda, digestão gastrointestinal *in vitro*, capacidade antioxidante, compostos fenólicos.

Abstract

Several studies have come to demonstrate, through *in vitro* assays, that herbal infusions have high antioxidant potential. However, in order for this potential to remain in physiological conditions it is necessary, among other conditions, that the compounds responsible resist gastrointestinal digestion. The aim of this work was the determination of the antioxidant capacity and quantification of phenolic compounds of two infusions with common consumption in Portugal, chamomile flower (*Matricaria chamomilla* L.) and sour-orange blossom (*Citrus aurantium*), before and after being submitted to a simulated gastrointestinal *in vitro* digestion. All samples were rated in terms of iron chelating power, cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC assay), ability to scavenge hydroxyl and superoxide anion radicals and quantification in total phenolic compounds and flavonoids.

In the case of the orange blossom infusion, the *in vitro* digestion simulation did not alter the phenolic compounds content, led to a 17% reduction in the flavonoid content and 8% in the CUPRAC value, not having any effects on superoxide anion radical scavenge. In regard to the chamomile infusion, the digestion simulation led to a reduction in 83% of the flavonoids value and 28% of the superoxide anion radical scavenge. For hydroxyl radical scavenge and Fe (II) chelation assays conclusions were unable to draw due to the interference of the digestive enzymes with the analytical techniques.

The obtained results allow concluding that, despite the differences observed before and after simulated gastrointestinal digestion, most compounds responsible for the antioxidant potential of chamomile and orange blossom infusions do not lose their activity during the digestive process, since both infusions have antioxidant capacity after undergoing *in vitro* digestion.

Keywords: Medicinal infusions, chamomile flower, sour orange blossom, gastrointestinal *in vitro* digestion, antioxidant capacity, phenolic compounds.

Índice de Matérias

Agradecimentos	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Índice de Matérias	vi
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	x
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 Radicais Livres.....	2
1.2 Antioxidantes	5
1.2.1. Compostos Fenólicos	7
1.2.2. Biodisponibilidade dos Compostos Fenólicos	10
1.3 Enzimas e Sistema Digestivo Humano	12
1.3.1. Sistema Digestivo Humano (Digestão <i>in vivo</i>).....	13
1.3.2. Reciclagem Enzimática	17
1.4 Simulação da Digestão (Digestão <i>in vitro</i>)	17
1.5 Alimentos Funcionais	18
1.6 Infusões de Plantas Medicinais	19
1.6.1. Flor de Camomila (<i>Matricaria chamomilla</i> L.)	21
1.6.2. Flor de Laranjeira (<i>Citrus aurantium</i>)	24
1.7 Efeito da simulação <i>in vitro</i> da digestão gastrointestinal nos compostos fenólicos.....	26
1.8 Objectivos	27
1.8.1 Objectivo Geral	28
1.8.2 Objectivos Específicos	28
Capítulo 2 – Materiais e Métodos.....	29
2.1. Caracterização das Infusões das Plantas Medicinais	30
2.1.1. Infusão de Flor de Camomila	30
2.1.2. Infusão de Flor de Laranjeira.....	30
2.2. Reagentes e Enzimas.....	31
2.3. Preparação das Amostras.....	31
2.3.1. Preparação das Infusões Medicinais	31
2.3.2. Elaboração da Digestão <i>in vitro</i>	31
2.4. Determinação do Conteúdo em Compostos Fenólicos Totais.....	32
2.4.1. Princípio do Método	32

2.4.2. Procedimento Experimental	33
2.5. Determinação do Conteúdo em Flavonóides Totais	33
2.5.1. Princípio do Método	33
2.5.2. Procedimento Experimental	34
2.6. Determinação da Capacidade Antioxidante.....	34
2.6.1. Avaliação da capacidade de redução do Cu (II) pelo ensaio CUPRAC	34
2.6.2. Avaliação da Capacidade de Quelação do Fe (II)	35
2.6.3. Capacidade de Sequestro do Radical Anião Superóxido	37
2.6.4. Capacidade de Sequestro do Radical Hidroxilo.....	38
2.7. Análise Estatística dos Resultados.....	40
Capítulo 3 – Resultados e Discussão.....	41
3.1. Preparação das Amostras.....	42
3.2. Determinação do Conteúdo em Fenólicos Totais	42
3.3. Determinação do Conteúdo em Flavonóides Totais	44
3.4. Determinação da Capacidade Antioxidante.....	46
3.4.1. Avaliação da redução do Cu (II) pelo ensaio CUPRAC.....	47
3.4.2. Determinação da Capacidade de Quelação do Fe (II)	48
3.4.3. Avaliação da Capacidade de Sequestro do $O_2^{\cdot-}$	50
3.4.4. Avaliação da Capacidade de Sequestro do HO^{\cdot}	52
Capítulo 4 – Conclusão	54
Capítulo 5 – Referências Bibliográficas.....	58

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Principais causas, alvos e consequências da acção dos radicais livres no organismo humano (Ferreira e Abreu, 2007).	3
Figura 1.2 – Principais classes de fitoquímicos naturais, indicando alguns exemplos concretos nos grupos mais estudados (Ferreira e Abreu, 2007).	7
Figura 1.3 – Estrutura geral dos ácidos fenólicos: (A) Estrutura geral dos ácidos hidroxibenzóicos e (B) Estrutura geral dos ácidos hidroxicinâmicos (Angelo e Jorge, 2007).	9
Figura 1.4 – Estrutura básica de alguns tipos de flavonóides (adaptado de Martínez-Flórez <i>et al.</i> , 2002).	9
Figura 1.5 – Sistema digestivo humano, incluindo o tracto gastrointestinal e alguns órgãos anexos (Giori, 2010).	13
Figura 1.6 – (A) Exemplar de flor de camomila (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) (retirado de www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/camomila/camomila.php) e (B) inflorescências da mesma após secagem (retirado de www.teatower.com/en/plants/1091-camomile-matricaria-recutita.html).	21
Figura 1.7 – (A) Flores e frutos de laranjeira-azeda (<i>Citrus aurantium</i>) (clinicadue2.blogspot.pt/2012/04/afine-silhueta-e-tenha-mais-disposicao.html) e (B) inflorescências após secagem (teatower.com/en/plants/1103-orange-blossoms-citrus-aurantium.html).	25
Figura 2.1 – Aspecto físico da flor de camomila e da respectiva infusão.	30
Figura 2.2 – Aspecto físico da flor de laranjeira-azeda e da respectiva infusão.	30
Figura 2.3 – Estrutura do (A) NBT ²⁺ e do (B) formazano (Valentão <i>et al.</i> , 2001).	37
Figura 2.4 – Sistema de Fenton, evidenciando as reacções necessárias à formação do radical hidroxilo (Filgueiras <i>et al.</i> , 2009).	39
Figura 2.5 – Reacções de formação do composto MDA-TBA (adaptado de Chobot, 2010).	39
Figura 3.1 – Conteúdo médio em compostos fenólicos totais das infusões medicinais e do controlo da digestão, valores com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste- <i>t</i> (<i>p</i> < 0,05).	43
Figura 3.2 – Conteúdo médio em flavonóides totais das infusões medicinais e do controlo da digestão, valores com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste- <i>t</i> (<i>p</i> < 0,05).	45
Figura 3.3 – Capacidade antioxidante das infusões e do controlo da digestão determinada pelo ensaio CUPRAC, valores com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste- <i>t</i> (<i>p</i> < 0,05).	47
Figura 3.4 – Capacidade de quelação do Fe (II) das infusões medicinais e do controlo da digestão, valores com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste <i>t</i> (<i>p</i> < 0,05).	49
Figura 3.5 – Efeito das infusões de flor de camomila [não digerida (A) e digerida (B)] e de flor de laranjeira [não digerida (C) e digerida (D)] sobre a redução do NBT ²⁺ induzida pelo O ₂ ⁻	51
Figura 3.6 – Capacidade de sequestro do HO [•] das infusões medicinais e do controlo da digestão, valores com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste- <i>t</i> (<i>p</i> < 0,05).	53

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Análise da infusão de flor de camomila através de diferentes ensaios por diferentes grupos de investigadores.	24
Tabela 3.1 – Conteúdo médio em compostos fenólicos totais das infusões medicinais e do controlo da digestão pelo método de Folin-Ciocalteu.	43
Tabela 3.2 – Conteúdo médio em flavonóides totais das infusões medicinais e do controlo da digestão.	45
Tabela 3.3 – Relação entre o teor em flavonóides e compostos fenólicos totais das infusões medicinais.	46
Tabela 3.4 – Capacidade antioxidante CUPRAC das infusões medicinais e do controlo da digestão.	47
Tabela 3.5 – Capacidade quelante média das infusões medicinais e do controlo da digestão determinada pelo ensaio de quelação do Fe (II).	49
Tabela 3.6 – Cl_{50} média das infusões medicinais determinada pelo ensaio de sequestro do $O_2^{\cdot-}$	51
Tabela 3.7 – Capacidade sequestrante média das infusões medicinais e do controlo da digestão determinada pelo ensaio de sequestro do HO^{\cdot}	52

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Abs – Absorvância;

ABTS^{•+} – Radical catião do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico;

ADN – Ácido desoxirribonucleico;

ARN - Ácido ribonucleico;

ATP – Trifosfato de adenosina;

CI₅₀ – Concentração inibitória a 50%;

CUPRAC – Capacidade antioxidante de redução cúprica;

DPPH[•] – Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila;

EAA – Equivalentes de ácido ascórbico;

EAG – Equivalentes de ácido gálico;

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético;

EEDTA – Equivalentes de EDTA;

ER – Equivalentes de rutina;

EQ – Equivalentes de quercetina;

FRAP – Poder de redução férrica do plasma;

HAT – Transferência de um átomo de hidrogénio;

MDA – Malonildialdeído;

NADH – Dinucleótido de nicotinamida-adenina na forma reduzida;

NBT²⁺ – Ião azul de nitrotetrazólio;

OMS – Organização Mundial de Saúde;

ORAC – Capacidade de absorção de radicais oxigénio;

PMS – Metossulfato de fenazina;

r² – Coeficiente de determinação;

RNS – Espécies reactivas de azoto;

rpm – Rotações por minuto;

ROS – Espécies reactivas de oxigénio;

SET – Transferência de um electrão;

TBA – Ácido tiobarbitúrico.

Capítulo 1 – Introdução

1. Stress Oxidativo e Antioxidantes

Nas últimas décadas, o aparecimento de determinadas doenças degenerativas no Homem tem sido bastante correlacionado com a presença de espécies radicalares que, quando em excesso, promovem reacções oxidativas nocivas ao organismo humano (Rizea *et al.*, 2010). Desta forma, para que o organismo funcione normalmente, torna-se essencial a existência de um equilíbrio entre a produção dessas mesmas espécies radicalares e a capacidade do organismo para as eliminar, ou seja, a capacidade de defesa antioxidante. Se uma célula tender para a perda desse equilíbrio, no sentido da formação de radicais livres em excesso, o organismo entra em *stress* oxidativo, o que pode levar a diversas consequências negativas para o funcionamento celular e ao despertar de variadas patologias (Ferreira e Abreu, 2007; Magalhães *et al.*, 2008; Dudonné *et al.*, 2009). Cada vez mais, os estudos epidemiológicos realçam a extrema importância da alimentação no desenvolvimento de doenças crónicas silenciosas (como é o caso da obesidade, doenças coronárias e cerebrovasculares, diversos tipos de cancro e diabetes), responsáveis pelas causas mais comuns de incapacidade e morte prematura em países desenvolvidos (Rodrigues *et al.*, 2008). Uma alimentação equilibrada e rica em alimentos com quantidades significativas de compostos fenólicos, que têm vindo a ser descritos como compostos com elevado potencial antioxidante, parece ser um factor capaz de ajudar a eliminar o excesso de espécies radicalares oxidativas, induzindo, simultaneamente, a activação de enzimas endógenas com função protectora, contribuindo assim para uma redução dos danos celulares oxidativos no organismo (Petisca, 2008).

1.1 Radicais Livres

Radicais livres são átomos ou moléculas que possuem uma ou mais orbitais com electrões desemparelhados, possuindo assim uma forte capacidade para reagir com a maioria das espécies químicas, devido à afinidade electrónica adquirida. Estes radicais são constantemente produzidos durante o funcionamento celular normal em organismos aeróbios e, quando em baixas concentrações, são benéficos para as células, estando integrados em diversos processos fisiológicos de sinalização e regulação. Sendo espécies instáveis que funcionam como dadores de electrões, os radicais livres podem também ser úteis na interceptação de microrganismos invasores do organismo (Petisca, 2008; Halliwell, 2011). As causas do *stress* oxidativo podem ser naturais (por exercício físico extremo, existência de processos inflamatórios ou processos de envelhecimento) ou não naturais (fármacos, contaminantes ambientais, xenobióticos alimentares, radiação ionizante) (Ferreira e Abreu, 2007; Koşar *et al.*, 2008) e a presença de radicais em excesso (por produção excessiva ou deficiência nas defesas antioxidantes) pode originar lesões em componentes celulares, conduzindo à inibição da sua função normal por modificação e/ou

inutilização. Desta forma, o *stress* oxidativo pode levar à oxidação dos lípidos, proteínas, açúcares e ácidos desoxirribonucleico (ADN) e ribonucleico (ARN), podendo assim contribuir para o desenvolvimento de inúmeras doenças (Figura 1.1) (Benavente-García *et al.*, 1997; Ferreira e Abreu, 2007; Dudonné *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2009; Halliwell, 2011), nomeadamente vários tipos de cancro, diabetes, cirrose, anemia, doenças cardiovasculares, auto-imunes e desordens neurodegenerativas crónicas, como as doenças de Parkinson e Alzheimer (Cervellati *et al.*, 2002; Ferreira e Abreu, 2007; Pereira *et al.*, 2009). Mais ainda, a toxicidade resultante da exposição à radiação ionizante ou a diversos xenobióticos, como, por exemplo, variados contaminantes ambientais ou fármacos anti-neoplásicos, deriva, pelo menos em parte, de todos estes factores poderem levar a um aumento do *stress* oxidativo (Cervellati *et al.*, 2002).

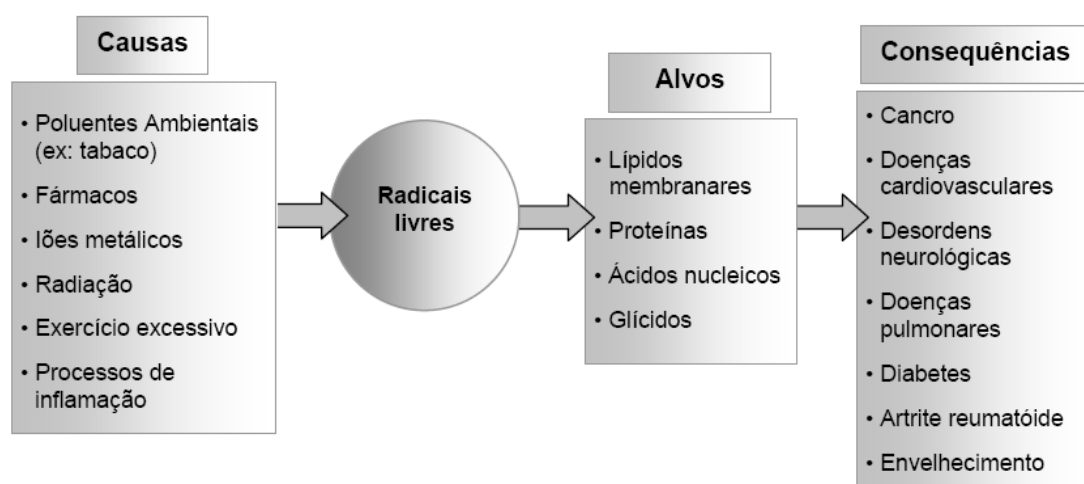
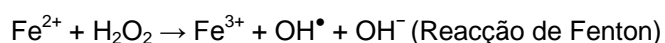


Figura 1.1 – Principais causas, alvos e consequências da acção dos radicais livres no organismo humano (Ferreira e Abreu, 2007).

O oxigénio molecular (O_2), apesar de extremamente importante para a manutenção da vida em organismos aeróbios, pode vir a ser tóxico em determinadas condições, sobretudo quando leva à produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), a classe mais importante de radicais livres formados pelo organismo (Valentão, 2002; Ferreira e Abreu, 2007; Petisca, 2008). A adição de um electrão a esta molécula provoca a formação do radical anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), uma ROS primária produzida não só por acção de sistemas enzimáticos celulares como através do metabolismo de fármacos e outros xenobióticos (Valentão, 2002; Ferreira e Abreu, 2007; Magalhães *et al.*, 2008) sendo, no entanto, as mitocôndrias o principal local de formação desta ROS. Cerca de 90% do O_2 inalado é utilizado pelas mitocôndrias no ciclo respiratório, sendo reduzido a água ao nível da cadeia respiratória através da via metabólica de fosforilação oxidativa, para produção de trifosfato de adenosina (ATP). Contudo, aproximadamente 4% desse O_2 mitocondrial não é reduzido completamente e, devido a uma “fuga” de electrões na cadeia

respiratória, é possível formarem-se variadas ROS (Valentão, 2002; Apak *et al.*, 2007; Halliwell, 2011).

O radical anião superóxido ($O_2^{\bullet -}$) poderá interagir com outras moléculas existentes no meio e formar ROS secundárias, como é o caso do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e do radical hidroxilo (OH^{\bullet}), sendo este último muito reactivo com moléculas de ADN. O peróxido de hidrogénio pode atravessar as membranas biológicas e, embora possa causar danos de forma directa através da sua capacidade oxidante, exerce-os principalmente de forma indirecta quando serve como fonte de outras espécies reactivas de oxigénio ainda mais deletérias, como é o caso do radical hidroxilo. Com efeito, o peróxido de hidrogénio, juntamente com o radical anião superóxido, podem gerar o aparecimento do radical hidroxilo através das reacções de Fenton e de Haber-Weiss (Buonocore *et al.*, 2010):



O oxigénio singlete constitui outra das importantes ROS e resulta da inversão de *spin* de um dos electrões desemparelhados do oxigénio molecular, que pode ocorrer através de um *input* de energia. Esta forma excitada do oxigénio molecular é altamente reactiva, podendo oxidar directamente proteínas, lípidos ou o ADN (Buonocore *et al.*, 2010).

As lesões oxidativas no ADN podem causar modificação das bases, quebra de uma ou ambas as cadeias, perda das bases com formação de locais apurínicos/apirimidínicos, danos na desoxirribose, ligações cruzadas entre ADN e proteínas e ainda danos indirectos resultantes da perda de actividade dos sistemas enzimáticos de reparação do ADN (Kohen e Nyska, 2002). Todas estas lesões podem conduzir a eventuais danos permanentes no material genético, originando situações de mutagénese, carcinogénese e envelhecimento celular.

Actuando sobre os lípidos de membrana, especialmente sensíveis a peroxidação lipídica por radicais livres, as ROS promovem a formação de outros tipos de espécies reactivas, particularmente radicais peroxilo (ROO^{\bullet}) que, se não forem neutralizados pelas defesas antioxidantes, irão desencadear reacções de propagação em cadeia (Apak *et al.*, 2007; Ferreira e Abreu, 2007; Magalhães *et al.*, 2008). Da peroxidação lipídica podem resultar danos nas membranas biológicas que podem conduzir à lise celular, podendo ainda formar-se compostos capazes de reagir e lesar diversas biomoléculas das células, incluindo o ADN, possuindo alguns deles, como é o caso do malonildialdeído (MDA), actividade cancerígena em ratos e mutagénica em células bacterianas e de mamíferos (Chung *et al.*, 1996). Para além da lipoperoxidação de ácidos gordos poli-insaturados, as ROS podem modificar as lipoproteínas de baixa densidade e, desta forma, contribuir para a patogénese da aterosclerose (Ryan e Aust, 1992).

Da interacção entre as ROS e as proteínas podem resultar danos em resíduos específicos de aminoácidos, alterações da estrutura terciária, degradação e fragmentação, o que pode traduzir-se por perda da sua funcionalidade biológica e portanto em alterações da actividade enzimática celular (Kohen e Nyska, 2002).

Além de ROS, também se podem formar espécies reactivas de azoto (RNS), sendo o óxido nítrico (NO^\bullet) o principal exemplo. Este radical é produzido naturalmente em tecidos biológicos, funcionando como uma abundante molécula de sinalização em muitos processos fisiológicos, mas a sua sobre-expressão pode conduzir à nitrosilação de proteínas com consequente inibição da sua função (Ferreira e Abreu, 2007). Se os radicais O_2^\bullet e NO^\bullet forem produzidos simultaneamente (o que pode acontecer, por exemplo, em células do sistema imunitário), poderão reagir formando o radical peroxinitrito (ONOO^\bullet), um agente oxidante extremamente potente que provoca fragmentação do ADN e oxidação lipídica (Ratnam *et al.*, 2006; Ferreira e Abreu, 2007).

1.2 Antioxidantes

A produção inevitável de radicais livres pelo organismo, com a consequente exposição celular aos mesmos, fez com que, adaptativamente, os organismos tenham vindo a desenvolver mecanismos de defesa (intra e extracelulares), que lhes permitam salvaguardar o equilíbrio de que necessitam para o funcionamento celular normal, minimizando os efeitos deletérios causados pelos agentes oxidantes (Valentão, 2002; Ferreira e Abreu, 2007; Han *et al.*, 2007). Em sistemas biológicos, uma substância antioxidante tem portanto a capacidade de reduzir eficazmente um composto pró-oxidante (que induz danos oxidativos em diferentes alvos biológicos), inibindo ou retardando a oxidação, com formação de produtos mais estáveis e com um nível de toxicidade baixo ou nulo, mesmo quando presente numa pequena concentração comparativamente à do substrato oxidável (Valentão, 2002; Bora *et al.*, 2005; Apak *et al.*, 2007; Magalhães *et al.*, 2008).

Os mecanismos de defesa celulares antioxidante endógenos incluem sistemas de defesa enzimáticos e não enzimáticos. A defesa antioxidante enzimática é constituída por enzimas capazes de bloquear o início da oxidação graças à existência de metais com múltiplas valências no seu centro activo, que impedem que elas próprias se tornem espécies radicalares. Dentro das enzimas antioxidantes encontram-se a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione redutase. Os antioxidantes não enzimáticos incluem, entre outros, compostos como a glutathione, o α -tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), o ácido lipóico, os carotenóides e os compostos fenólicos. Estes compostos interagem com as espécies radicalares sendo consumidos durante a reacção (Valentão, 2002; Moreira e Mancini-Filho, 2004; Angelo e Jorge, 2007; Ferreira e Abreu, 2007; Afonso, 2010). Todas estas defesas antioxidantes têm capacidade para eliminar os radicais livres que se formam em excesso e diminuir as reacções oxidativas perigosas e destrutivas, quando desencadeadas em ambiente celular (Rizea *et al.*, 2010).

Os compostos antioxidantes neutralizam os radicais livres recorrendo a diversos mecanismos (Prior *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2008):

- Capacidade de sequestro de espécies reactivas através da transferência de um átomo de hidrogénio (mecanismo HAT de *hydrogen atom transfer*);
- Actividade redutora (mecanismo SET de *single electron transfer*);
- Capacidade de quelação de metais, em especial o Fe^{2+} e o Cu^+ , evitando, deste modo, a formação de radicais hidroxilo através das reacções de Fenton;
- Indução das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase ou glutatíon peroxidase);
- Inibição de enzimas oxidativas (xantina oxidase, ciclooxygenases, citocromos P450).

O mecanismo dominante e a sua respectiva eficácia são determinados pela estrutura e propriedades do antioxidante em questão (Prior *et al.*, 2005). Um grande número de antioxidantes tem também a capacidade de inibir a formação ou a actividade de mutagénicos, visto que as ROS (em especial o radical hidroxilo e o oxigénio singleto) e os processos de peroxidação lipídica representam dois factores significativos para a indução dos processos de mutagénese e carcinogénese (Petisca, 2008).

Dados epidemiológicos comprovam que o consumo de alimentos de origem vegetal está associado a uma menor incidência e mortalidade por doenças crónicas não transmissíveis (já referidas anteriormente), exactamente pela protecção que esses alimentos providenciam contra tais doenças degenerativas (Anjo, 2004; Manach *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2007; Petisca, 2008; Dudonné *et al.*, 2009). Determinadas plantas têm uma elevada concentração de compostos com capacidade antioxidante e, ao longo do tempo, têm vindo a ser utilizadas na medicina tradicional para prevenção ou tratamento de múltiplas patologias. Nos dias de hoje, estas plantas continuam a ter um crescente interesse na fitoterapia preventiva e curativa (Serrano *et al.*, 2007; Rizea *et al.*, 2010).

As diferentes partes da maioria dos alimentos vegetais ingeridos diariamente numa dieta equilibrada (sementes, cereais, legumes, frutos, folhas, raízes, especiarias e ervas), possui na sua constituição diversas moléculas naturais bioactivas, com propriedades antioxidantes, que se designam, genericamente, por compostos fitoquímicos, tendo já sido evidenciado o seu potencial na modificação favorável do metabolismo humano, no que se refere à prevenção de doenças crónicas e degenerativas (Cervellati *et al.*, 2002; Al-Ismail e Aburjai, 2004; Anjo, 2004; Nichenametla *et al.*, 2006; Ferreira e Abreu, 2007; Pereira *et al.*, 2009; Srivastava e Gupta, 2009). É também sugerido que estes compostos tenham efeitos aditivos e sinérgicos, originando assim uma actividade antioxidante e anticancerígena muito mais considerável do que se actuassem isolados (Al-Ismail e Aburjai, 2004; Dinnella *et al.*, 2007; Ferreira e Abreu, 2007; Pérez-Jiménez *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2009).

Os compostos fitoquímicos auxiliam os mecanismos endógenos de defesa, sendo a sua ingestão média numa dieta alimentar que inclua frutas, verduras, chá e vinho tinto, de cerca de 1 a 1,5 g/dia. Foram já identificadas diversas famílias de fitoquímicos diferentes (Figura 1.2) (Ferreira e Abreu, 2007), estando mais estudados os compostos fenólicos e os carotenóides (Anjo, 2004; Ferreira e Abreu, 2007). No entanto, existe ainda uma grande percentagem de compostos desconhecida, sendo a sua rápida identificação da maior importância, para que, caso sejam benéficos ao organismo, possam passar a ser mais incluídos na dieta alimentar humana (Ferreira e Abreu, 2007).

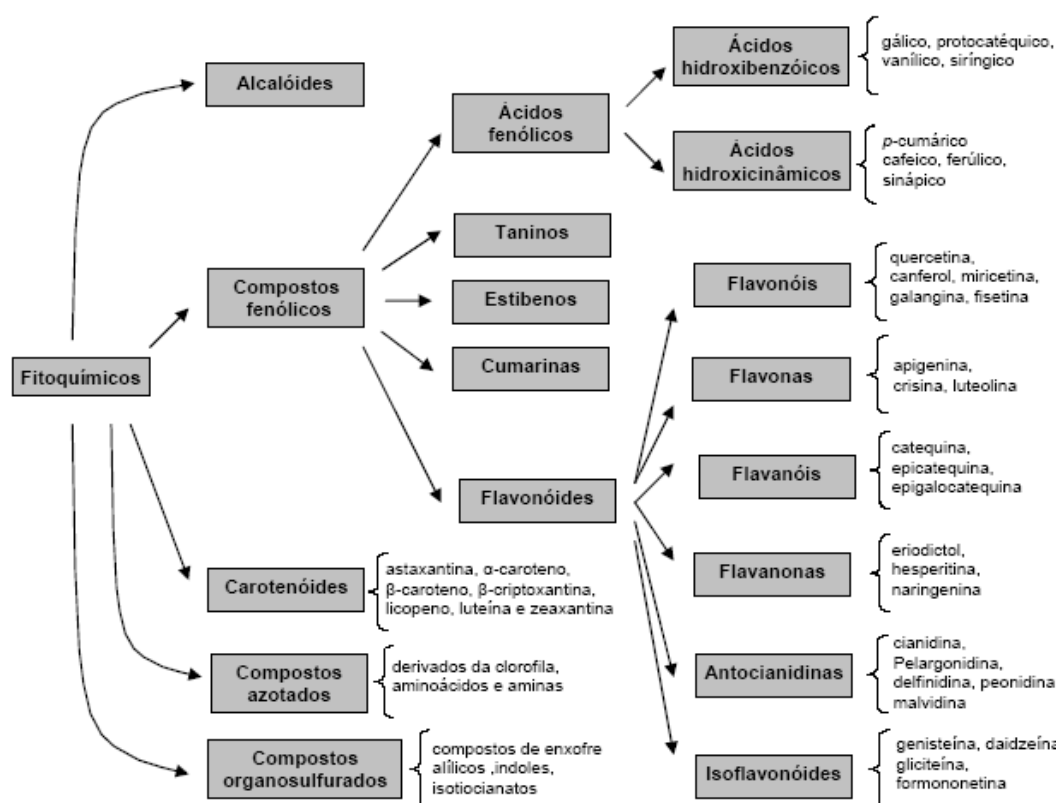


Figura 1.2 – Principais classes de fitoquímicos naturais, indicando exemplos concretos nalguns dos grupos estudados (Ferreira e Abreu, 2007).

1.2.1. Compostos Fenólicos

Dentro dos compostos fitoquímicos encontra-se a classe dos compostos fenólicos. Estes incluem uma enorme variedade de metabolitos secundários das plantas, encontrando-se em frutas, chá verde e preto, café, chocolate, vegetais, legumes secos, azeite e cereais (Charlton *et al.*, 2002; Moreira e Mancini-Filho, 2004; Han *et al.*, 2007; Cilla *et al.*, 2011; Landete, 2012). Nas plantas, estes compostos são essenciais para o seu crescimento, pigmentação e reprodução,

actuando igualmente como agentes antipatogénicos e de resposta a condições de *stress* como, por exemplo, a existência de ferimentos ou a exposição intensa à radiação ultravioleta (Haslam, 1989; Angelo e Jorge, 2007; Stevenson e Hurst, 2007).

Em alimentos, dependendo do composto em causa, podem ser responsáveis pela adstringência, amargura, cor, sabor, aroma e estabilidade oxidativa (Charlton *et al.*, 2002; Papadopoulou e Frazier, 2004; Angelo e Jorge, 2007; Landete, 2012). Alguns destes compostos, quando ingeridos, produzem na boca uma sensação de constrição, seca e aspereza (Haslam, 1989), devido à sua complexação com proteínas salivares, com consequente precipitação de complexos insolúveis (Papadopoulou e Frazier, 2004), um mecanismo de defesa para tornar os tecidos vegetais indesejáveis a potenciais predadores (Haslam, 1989). Na indústria alimentar, são adicionados aos alimentos, principalmente para prolongar o tempo de prateleira de um produto (Dudonné *et al.*, 2009).

Com mais de 8000 variantes estruturais já identificadas, os compostos fenólicos constituem uma das famílias de antioxidantes mais abundante na dieta alimentar humana (Cervellati *et al.*, 2002; Landete, 2012). A sua classificação em grupos é feita pelo número de anéis fenólicos que possuem e pelo tipo de elementos estruturais que ligam esses mesmos anéis (Papadopoulou e Frazier, 2004; Han *et al.*, 2007; Stevenson e Hurst, 2007; Dudonné *et al.*, 2009; Afonso, 2010). Assim, de acordo com o seu esqueleto de átomos de carbono, os compostos fenólicos podem ser classificados em diversas categorias que incluem os flavonóides, ácidos fenólicos, estilbenos, cumarinas e taninos (Figura 1.2) (Ferreira e Abreu, 2007). Não é possível ter uma informação precisa do *intake* dietético de compostos fenólicos, no entanto, algumas estimativas referem que o grupo dos ácidos fenólicos constitui cerca de 30% do *intake* total de compostos fenólicos, enquanto os flavonóides (principalmente flavanóis e antocianidinas) são responsáveis por 60% (Nichenametla *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2007; Landete, 2012).

Os ácidos fenólicos são compostos que apresentam um anel benzénico, um grupo carboxilo e um ou mais grupos hidroxilo. Estes podem ser divididos em dois grupos: derivados do ácido hidroxibenzóico, que apresentam sete átomos de carbono (C6-C1) e derivados do ácido hidroxicinâmico, que apresentam nove átomos de carbono (C6-C3) (Figura 1.3) (Angelo e Jorge, 2007; Apak *et al.*, 2007).

De acordo com a sua estrutura, os flavonóides podem ser divididos em sub-grupos que incluem as flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanóis ou catequinas, antocianidinas e isoflavonas (Figura 1.4) (Ferreira e Abreu, 2007). Apesar de serem agliconas, na Natureza, os flavonóides encontram-se geralmente na forma glicosilada (Cervellati *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005; Landete, 2012), graças à sua conjugação com açúcares (Apak *et al.*, 2007).

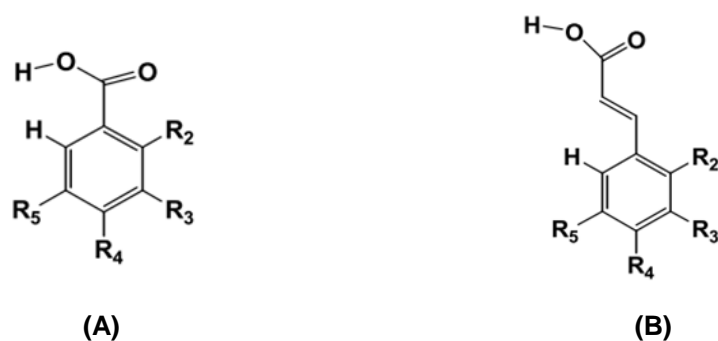


Figura 1.3 – Estrutura geral dos ácidos fenólicos: **(A)** Estrutura geral dos ácidos hidroxibenzoicos e **(B)** Estrutura geral dos ácidos hidroxicinâmicos (Angelo e Jorge, 2007).

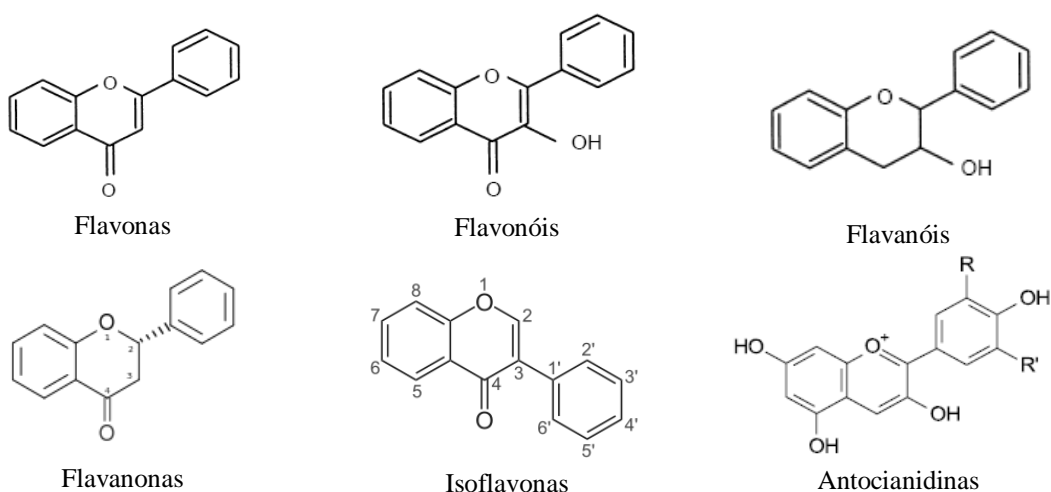


Figura 1.4 – Estrutura básica de alguns tipos de flavonóides (adaptado de Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

Os compostos fenólicos têm vindo a ser classificados como potentes inibidores de danos oxidativos. Esta sua acção parece relacionar-se com a existência de um ou mais grupos hidroxílicos ligados aos seus anéis aromáticos. Assim, os compostos com maior número de grupos hidroxilo e de ligações duplas são, normalmente, aqueles que apresentam um potencial antioxidante mais elevado (Salah *et al.*, 1995). No entanto, essa mesma eficácia decresce com a presença dos açúcares aos quais estão ligados, visto que os glicósidos são muito menos bioactivos, em comparação com as agliconas correspondentes (Landete, 2012). A actividade antioxidante dos compostos fenólicos é maioritariamente manifestada pela eliminação da actividade radicalar de espécies reactivas (como $O_2^{\cdot-}$) ou de radicais promotores de peroxidação lipídica (como ROO^{\cdot}), normalmente por mecanismos HAT ou SET ou pela prevenção da produção de espécies reactivas catalisada por metais de transição (através das reacções de Fenton), através da quelação de metais (Apak *et al.*, 2007).

Para além da sua actividade antioxidante, diversos trabalhos têm vindo a conferir aos compostos fenólicos, entre outras propriedades, capacidades antiapoptóticas, antienvhecimento, anticarcinogénicas, anti-inflamatórias e inibitórias da proliferação celular, a maioria delas atribuídas às suas capacidades redutoras intrínsecas, podendo também oferecer uma protecção indirecta por activação de sistemas de defesa endógenos e por modelação de processos de sinalização celular (Haslam, 1989; Moreira e Mancini-Filho, 2004; Nichenametla *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2007; Siracusa *et al.*, 2011), sendo cada vez mais considerados como eficazes agentes de protecção (Manach *et al.*, 2005). A corroborar as actividades biológicas detectadas nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, diversos estudos epidemiológicos evidenciam que um baixo consumo de alimentos ricos nestes compostos aumenta para o dobro o risco de cancro, comparativamente a um *intake* elevado, com maior significância em cancros do tracto gastrointestinal (Block *et al.*, 1992), tendo sido provada, igualmente por estudos epidemiológicos, a existência de uma correlação positiva entre a ingestão de compostos fenólicos e uma melhoria da saúde (Nichenametla *et al.*, 2006).

Por outro lado, a contrastar com todos os efeitos benéficos, os compostos fenólicos podem também promover reacções indesejadas, agindo como pró-oxidantes, ao estarem presentes em doses muito elevadas ou na presença de outras substâncias, como, por exemplo, o óxido nítrico. Os compostos fenólicos podem reduzir o ferro (III) a ferro (II) e, assim, gerar radicais hidroxilo através da reacção de Fenton. Podem também ser reduzidos a quinonas e entrar em ciclos *redox*, originando a produção de ROS. Alguns compostos fenólicos podem ainda, no decurso da sua regeneração, gerar radicais secundários reactivos capazes de oxidar proteínas e lípidos. Radicais hidroxilo derivados de flavonóides mostraram poder iniciar a peroxidação de lípidos das membranas celulares e causar danos ao nível do ADN (Ferguson, 2001; Moreira e Mancini-Filho, 2004). Adicionalmente, os compostos fenólicos têm sido considerados "antinutrientes", pela sua capacidade de reduzir a absorção de diversos minerais, bem como a digestibilidade das proteínas provocando um aumento da excreção fecal de azoto (Ferguson, 2001).

1.2.2. Biodisponibilidade dos Compostos Fenólicos

Sendo constituintes muito comuns na dieta alimentar e mesmo que o *intake* diário de compostos fenólicos seja bastante considerável, para que se atinjam efeitos benéficos na saúde é essencial que estes compostos bioactivos estejam biodisponíveis de alguma forma, sendo efectivamente absorvidos do tracto gastrointestinal para a circulação sanguínea e distribuídos pela mesma às localizações apropriadas dentro do organismo (Landete, 2012; Liang *et al.*, 2012).

Compostos biodisponíveis são aqueles que entram na corrente sanguínea após separação da sua matriz no tracto gastrointestinal e atingem o seu local de acção biológica, tendo em conta toda a sequência de eventos que ocorrem durante a transformação digestiva dos alimentos, incluindo a sua disponibilidade para absorção intestinal e a sua degradação metabólica. Assim, não é uma característica exclusiva do alimento e pode ser afectada por diversos factores,

nomeadamente variações na actividade enzimática, pH do meio, motilidade intestinal, solubilidade, permeabilidade, biotransformação, entre outros (Ratnam *et al.*, 2006; Giori, 2010).

É aceite que a biodisponibilidade dos compostos fenólicos é bastante baixa (Serrano *et al.*, 2007; Landete, 2012), ainda mais quando se trata de compostos com grande peso molecular, estando descrito que o conteúdo alimentar em compostos fenólicos complexos é bastante mais elevado do que o conteúdo em compostos fenólicos simples. Embora a concentração máxima no plasma humano raramente exceda 1 mM após o consumo de 10-100 mg de um único composto fenólico, a verdade é que a maioria das classes fenólicas são suficientemente absorvidas para que lhes seja permitido exercer efeitos biológicos, sendo a concentração total no plasma demonstrativa de que os mesmos atravessam efectivamente a barreira intestinal e chegam à corrente sanguínea. Essa absorção é determinada primariamente pela sua estrutura química, que depende de factores como a glicosilação, acilação, estrutura básica, conjugação com outros compostos fenólicos, tamanho molecular, grau de polimerização e solubilidade. De facto, os glicósidos são pobremente absorvidos no intestino delgado, comparativamente à absorção das respectivas agliconas (Landete, 2012).

Os compostos fenólicos nativos podem ser absorvidos no tracto gastrointestinal anterior por diversos mecanismos, ainda não totalmente caracterizados. Cerca de 5 a 10% são absorvidos por interacção com transportadores de açúcares (como é o caso de alguns glicósidos) e difusão passiva (no caso das agliconas mais hidrofóbicas) (Stevenson e Hurst, 2007). A restante percentagem de compostos, não absorvidos, atinge o cólon, onde sofre acção enzimática própria da microflora existente, sendo extensivamente metabolizados numa grande variedade biodisponível de metabolitos secundários de baixo peso molecular com interesse biológico, a maioria por remoção dos grupos –OH, estes mais fáceis de absorver. As transformações sofridas no cólon são geralmente essenciais para a absorção e são provavelmente as moduladoras da actividade biológica destes compostos (Landete, 2012). Esta metabolização pela flora intestinal tem sido pouco estudada mas pode ter um efeito preponderante nas actividades biológicas destes compostos, uma vez que os metabolitos que origina podem ser passíveis de ser absorvidos no epitélio do cólon e, desta forma, chegar à corrente sanguínea. Por exemplo, as proantocianidinas têm demonstrado alguns efeitos em ensaios epidemiológicos embora se saiba que a sua absorção intestinal é muito reduzida. Desta forma, é possível que os efeitos biológicos associados a estes compostos resultem de algum metabolito formado no decurso da sua metabolização pelas bactérias da flora intestinal (Manach *et al.*, 2005).

Mesmo sendo absorvidos, os compostos fenólicos podem ainda ser alterados por acção das enzimas de biotransformação, podendo, nesse processo, ver alterada a sua actividade biológica. Assim, estes compostos podem ser hidroxilados pelos citocromos P450 ou conjugados com grupos glucorónido, sulfato ou metilo (Han *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 2007; Stevenson e Hurst, 2007; Landete, 2012).

Evidenciando uma diversidade estrutural considerável, o que tem influência na sua biodisponibilidade, nem sempre os compostos mais abundantes são os que atingem concentrações mais elevadas nos tecidos-alvo, existindo uma alargada variabilidade na biodisponibilidade dos diferentes compostos fenólicos. As isoflavonas e os ácidos fenólicos são os mais bem absorvidos, seguidos pelas catequinas e flavanonas, sendo os menos absorvidos os de maior peso molecular (Manach *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2007). Os metabolitos presentes no sangue, resultantes da actividade digestiva e hepática, usualmente diferem dos compostos fenólicos nativos constituintes dos alimentos ingeridos (Manach *et al.*, 2005). No caso dos flavonóides em geral, o mais comum é serem absorvidos na forma de agliconas após terem sofrido hidrólise no tracto digestivo (substituindo o grupo glicosil de um glicósido por um grupo – OH), sendo potencialmente mais bioactivos que os compostos que lhes deram origem (Humadi e Istudor, 2008; Landete, 2012).

Mesmo não sendo absorvidos pelo epitélio intestinal, os polifenóis dietéticos podem exercer as suas funções benéficas no próprio intestino, desactivando espécies oxidativas que se encontrem ou se formem ao longo do tubo digestivo, impedindo, desta forma, que elas possam vir a exercer os seus efeitos deletérios (Han *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 2007). No entanto, quer para exercerem os seus efeitos no lúmen intestinal, quer de forma sistémica, após absorção, os compostos fenólicos precisam de manter a sua actividade biológica no decurso da digestão gastrointestinal. Com efeito, estes são ingeridos como constituintes de uma matriz alimentar que irá passar por um processo de digestão que pode afectar a sua estrutura e, consequentemente, os seus possíveis efeitos benéficos nas células e tecidos-alvo (Bermúdez-Soto *et al.*, 2007).

1.3 Enzimas e Sistema Digestivo Humano

No processo da digestão extracelular, ao longo do tracto gastrointestinal, a parte orgânica dos alimentos ingeridos fica exposta a diversos tratamentos físicos e químicos, a diferentes regiões ácidas e alcalinas e a sucos digestivos adicionados durante fases apropriadas à medida que o alimento passa através do tubo digestivo, sendo reduzidos em unidades mais elementares, para que possa ocorrer a absorção dos macro e micronutrientes de que o organismo necessita para funcionar em pleno (Hickman *et al.*, 2006).

Elementos de importância preponderante no processo digestivo são as enzimas digestivas. Estas são classificadas como enzimas hidrolíticas (hidrolases), pois dividem as macromoléculas constituintes dos alimentos ingeridos por um processo de hidrólise (quebra da ligação química por adição de uma molécula de água). Na maioria dos casos, os produtos da reacção, por sua vez, terão de ser submetidos a sucessivas divisões para que as moléculas originais sejam totalmente decompostas em subunidades mais simples (em tamanho e complexidade), tornando-se mais solúveis e facilmente absorvidas pela mucosa intestinal (Hickman *et al.*, 2006; Giori, 2010). A única excepção acontece relativamente a alguns lípidos que, ao contrário das proteínas e dos

glicídios, poderão ser absorvidos sem sofrerem hidrólise completa, pois são passíveis de se difundir através da membrana plasmática das células do tracto digestivo. Dada a especificidade enzimática, existem enzimas próprias para a digestão de cada classe de compostos orgânicos, estando as suas células secretoras localizadas em regiões específicas do tubo digestivo, constituindo assim uma cadeia enzimática, onde uma enzima pode finalizar o que outra começou à medida que os produtos se movem no tracto digestivo (Hickman *et al.*, 2006).

1.3.1. Sistema Digestivo Humano (Digestão *in vivo*)

O tubo digestivo humano é constituído por boca, faringe, esófago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), intestino grosso (ceco, cólon – ascendente, transversal, descendente e sigmóide – e recto) e ânus (Figura 1.5), estando-lhe associados outros órgãos e glândulas secretoras anexos que também participam na digestão (Giori, 2010). Pode ser dividido em cinco regiões principais onde o alimento vai progredindo, permitindo que a digestão se dê em fases sequenciais (Hickman *et al.*, 2006).

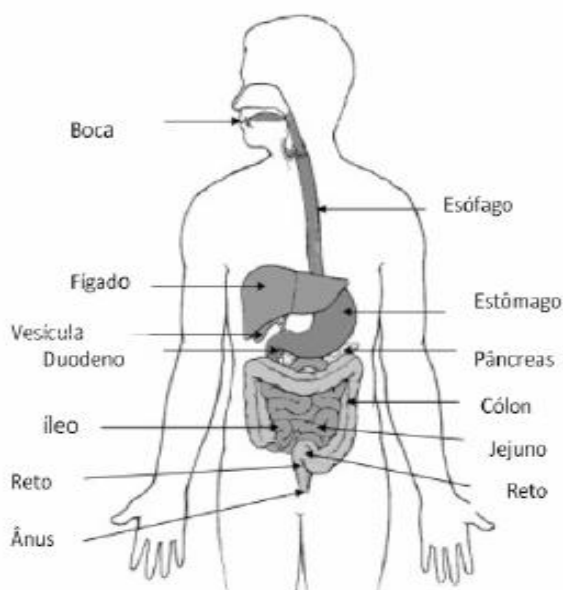


Figura 1.5 – Sistema digestivo humano, incluindo o tracto gastrointestinal e alguns órgãos anexos (Giori, 2010).

1.3.1.1. Região de Recepção

Constituída pela cavidade bucal, peças acessórias, faringe e glândulas salivares, prepara o alimento para digestão através da mastigação e ensalivação, facilitando a acção enzimática

subsequente. Por cada 20 gramas de alimento sólido as glândulas salivares secretam 10 mL de saliva, uma secreção química com pH 6,0-7,4, composta por água, muco e enzimas que, além de lubrificar/facilitar a deglutição (pela produção de mucina – composto orgânico altamente viscoso) e possuir anticorpos para eliminar bactérias, inicia a digestão química de glícidos através da amilase salivar (α -amilase ou ptialina). Esta hidrolase inicia a digestão do amido mas não a finaliza, deixando os produtos maioritariamente na forma de maltose. À medida que o alimento se transforma em bolo alimentar (alimento mastigado misturado com saliva) e vai sendo engolido para o esófago, a α -amilase continua a actuar, digerindo cerca de metade do amido antes de ser inactivada pelo ambiente ácido estomacal, sendo o restante degradado no intestino (Hickman *et al.*, 2006; Giori, 2010; Lidon e Silvestre, 2010; Gião *et al.*, 2012).

1.3.1.2. Região de Transporte

Composta pelo esófago, corresponde à região de passagem do bolo alimentar em direcção à zona digestiva, através de movimentos peristálticos, cujo percurso demora cerca de 5 a 10 segundos (Hickman *et al.*, 2006; Giori, 2010; Lidon e Silvestre, 2010).

1.3.1.3. Região de Mistura e Digestão Inicial

Constituída pelo estômago, um tubo muscular em forma de “U” com glândulas produtoras de enzimas proteolíticas e de ácidos fortes, providencia a digestão inicial, misturando o bolo alimentar com os sucos digestivos produzidos pelo mesmo (Hickman *et al.*, 2006).

A quimificação (transformação do bolo alimentar em quimo) inicia-se com o processo de mistura do bolo alimentar com o suco gástrico, após a sua entrada no estômago (Adkin *et al.*, 1995), através de movimentos segmentares (constrição alternada da musculatura lisa que constantemente divide e espreme o conteúdo estomacal) (Hickman *et al.*, 2006). Após isso dão-se actos de contracção e expansão alternada do estômago, até que todo o bolo alimentar esteja convertido em quimo, podendo então ser transferido para o intestino, recorrendo a movimentos peristálticos (acção muscular que movimenta o alimento ao longo do tubo com ondas de contracção da musculatura circular atrás e de relaxamento à frente), numa taxa de cerca de 3 por minuto (Hickman *et al.*, 2006). O suco gástrico, secretado num volume de aproximadamente 2-3 L/dia, tem uma produção intermitente, que aumenta aquando da estimulação por alimentos (visão e/ou cheiro), presença de alimento no estômago e/ou estados emocionais (ansiedade, raiva) (Hickman *et al.*, 2006).

As glândulas gástricas são constituídas por diferentes tipos de células, cada uma secretando diferentes substâncias que vão constituir o suco gástrico: muco, enzimas, sais e ácido clorídrico (Hickman *et al.*, 2006). O muco (constituído por água, sais e mucina) protege a mucosa estomacal de lesões mecânicas e químicas. O ácido clorídrico, que altera o ambiente para ácido

médio (pH 1,6-2,4), é essencial para facilitar a fragmentação de macromoléculas, esterilizar o bolo alimentar e activar o pepsinogénio (Hickman *et al.*, 2006; Lidon e Silvestre, 2010). Este é o precursor da pepsina, uma protease com especificidade preferencial para certas ligações peptídicas (Hickman *et al.*, 2006), que se torna inactiva a pH acima de 5,0 (Giori, 2010) e com uma secreção de cerca de 10 mg/dia (Hur *et al.*, 2011). Apesar de a sua especificidade não permitir a degradação completa em aminoácidos, os péptidos produzidos serão posteriormente mais facilmente degradados por proteases intestinais (Hickman *et al.*, 2006). O suco possui ainda lipase gástrica para digestão de gorduras (Lidon e Silvestre, 2010).

1.3.1.4. Região de Digestão Final e Absorção

Do estômago, o quimo vai passando em pequenas porções para o duodeno, onde são secretados suco pancreático e biliar, ambos com um conteúdo elevado de ião bicarbonato (HCO_3^-) que neutraliza o ácido gástrico e eleva o pH de 1,5 para cerca de 7, passando o quimo a designar-se quilo. Esta mudança de pH é essencial pois as enzimas intestinais apenas actuam em ambientes de pH neutro ou ligeiramente alcalino. O quilo vai então progredindo no lúmen intestinal através de movimentos rítmicos segmentares, que ajudam à dispersão e mistura do conteúdo intestinal com os sucos secretados e permitem uma melhor digestão e absorção, e ondas peristálticas, para progressão do quilo ao longo do intestino (Singleton e Rowe, 1954; Adkin *et al.*, 1995) aumentando lentamente o pH de 6 (no duodeno) para 8 (no íleo terminal) à medida que a progressão se dá (Borgström *et al.*, 1957).

As células superficiais constituintes da parede interna do intestino delgado (mucosa) secretam suco entérico, uma solução de pH neutro, rica em enzimas que continuam a digestão, como aminopeptidases, dissacaridases (como maltase, sacarase e lactase), fosfatases alcalinas, nucleotidases e nucleosidases (Hickman *et al.*, 2006). O suco pancreático, produto do pâncreas, cujo pH oscila entre 8,5 e 9, contém tripsinogénio e quimiotripsinogénio (precursores inactivos) que, após secretados para o lúmen intestinal, sofrem acção enzimática, originando tripsina e quimiotripsina, respectivamente (Soares *et al.*, 1999), proteases altamente específicas que continuam a degradação enzimática iniciada pela pepsina (inactivada pela alcalinidade intestinal). O suco pancreático possui igualmente outras enzimas, como a carboxipeptidase, nucleases, lipase pancreática e amilase pancreática (Hickman *et al.*, 2006; Lidon e Silvestre, 2010).

O fígado é responsável pela produção de biliar, cujo pH varia entre 8 e 8,5 (Lidon e Silvestre, 2010), e é constituída essencialmente por água, sais biliares e pigmentos, não possuindo enzimas de nenhum tipo. Entre refeições é armazenada na vesícula biliar que a lança quando estimulada pela presença de gorduras, percorrendo o ducto biliar até chegar ao duodeno, onde é secretada juntamente com o suco pancreático (Hickman *et al.*, 2006). Após a sua actuação, os sais biliares são absorvidos pelas células da parede do íleo, reacumulados no fígado, conservados na vesícula biliar e novamente secretados no próximo ciclo de digestão (circulação enterohepática) (Rothman

et al., 2002; Lidon e Silvestre, 2010), dando-se este processo cerca de duas vezes durante a digestão e absorção do conteúdo intestinal (Borgström *et al.*, 1957), 10 a 12 vezes por dia (Lidon e Silvestre, 2010). Os sais biliares (principalmente glicolato e taurocolato de sódio) são essenciais na digestão pois reduzem a tensão superficial dos glóbulos de gordura (resistentes à digestão enzimática), permitindo aos movimentos intestinais uma emulsificação dos mesmos, o que faz com que as lipases do suco pancreático sejam capazes de alcançar e hidrolisar os triglicéridos em ácidos gordos e monoglicéridos. Após este processo, esses produtos vão-se complexar com os sais de bÍlis e formar micelas. Os pigmentos biliares (produtos da quebra de hemoglobina proveniente de glóbulos vermelhos envelhecidos, que é feita no fÍgado) dão uma cor amarela-esverdeada à secreção e dão às fezes a sua cor característica (Hickman *et al.*, 2006; Giori, 2010).

Algumas substâncias, como alguns fármacos lipossolúveis e o álcool são passÍveis de ser absorvidos logo no estÍmago mas, tendo este uma área de superfície de absorção bastante limitativa, os componentes nutricionais são essencialmente absorvidos ao nível do intestino (Hickman *et al.*, 2006), mais propriamente no duodeno distal e no princípio do jejuno (Borgström *et al.*, 1957), onde inúmeras vilosidades e microvilosidades providenciam uma enorme área de superfície através da qual os nutrientes podem passar do lúmen intestinal para a corrente sanguínea (Hickman *et al.*, 2006; Giori, 2010). Os glÍcidos são absorvidos quase unicamente como açúcares simples e as proteínas como aminoácidos e fragmentos peptÍdicos, embora também haja a rara absorção de proteínas (Hickman *et al.*, 2006). O processo de transporte passivo permite que, imediatamente após uma refeição, os compostos, estando em elevada concentração no lúmen digestivo, sejam rapidamente difundidos por transporte facilitado para a corrente sanguínea, onde a sua concentração é inicialmente baixa. Quando a concentração das substâncias começa a tornar-se idêntica em ambos os lados, o transporte activo localizado nas células do epÍtÍlio impede que muitos nutrientes sejam perdidos nas fezes, sendo que alguns açúcares e a maioria dos aminoácidos têm mecanismos de transporte específicos. Relativamente às micelas lipÍdicas, quando estas contactam com as microvilosidades intestinais, os ácidos gordos e os monoglicéridos são também absorvidos por difusão simples (Hickman *et al.*, 2006).

1.3.1.5. Região de Absorção de Água e Concentração de ResÍduos

Constituída pelo intestino grosso, consolida os remanescentes indigerÍveis por absorção de água e íões, que aí chegam de forma passiva, formando assim fezes sólidas ou semi-sólidas que se deslocam no mesmo por peristálise em massa e são removidas do organismo por defecação. As bactÍrias presentes naturalmente no cólon podem ter benefícios nutricionais, na medida em que sintetizam certas vitaminas e metabolizam compostos, ambos posteriormente absorvidos pelas células intestinais, ou fornecem celulasas que degradam alguma da celulose ingerida (Singleton e Rowe, 1954; Hickman *et al.*, 2006).

1.3.2. Reciclagem Enzimática

É conhecido que 95 a 99% da actividade enzimática digestiva desaparece à medida que o quimo se transforma em quilo e vai passando para o cólon (Rothman *et al.*, 2002) e estudos realizados no final dos anos 50 sugeriram haver uma digestão e absorção paralela entre as proteínas alimentares e as enzimáticas, assim como a existência de um *turnover* proteico nas glândulas digestivas (Borgström *et al.*, 1957), mas supondo-se antes que as enzimas seriam parcialmente inactivadas ou auto-digeridas no lúmen intestinal, tendo em conta o decréscimo de concentração verificado ao longo do percurso intestinal (Borgström *et al.*, 1957), visto que proteínas intactas não poderiam ser absorvidas sem digestão proteolítica prévia (Heinrich *et al.*, 1979), sabe-se agora que as paredes do intestino delgado e do pâncreas são permeáveis a uma variedade de proteínas, incluindo várias enzimas digestivas e que o plasma sanguíneo possui inibidores proteásicos que poderão servir também como “*carriers*”, refutando a ideia de que a presença de enzimas digestivas na corrente sanguínea destruiria os constituintes do sangue e até os órgãos (Rothman *et al.*, 2002). Algumas experiências conferiram evidência de que cada digestão não é processada por um conjunto enzimático completamente novo posteriormente degradado com o alimento que digere. Antes, uma grande fracção das enzimas secretadas é absorvida e reciclada através de uma circulação enterohepática, se forem enzimas produzidas pelo fígado, ou enteropancreática, se forem produzidas pelo pâncreas. Esta absorção é feita selectivamente através do intestino para a corrente sanguínea e aplica-se a enzimas digestivas intactas e funcionais (Heinrich *et al.*, 1979; Rothman *et al.*, 2002). Estima-se que a absorção de tripsina ronde os 50-70%, conservando-se assim quantidades consideráveis de energia para outros processos metabólicos que, de outro modo, seriam para a sua síntese *de novo* (Heinrich *et al.*, 1979). Por exemplo, o pâncreas apenas produz um terço das proteínas necessárias e os ribossomas apenas conseguem sintetizar 6 a 24% do que se estima ser necessário à secreção diária. Assim, tal “reciclagem” faz todo o sentido, visto a produção de proteínas pelo organismo ser um processo com elevados custos energéticos e estando as enzimas digestivas entre as proteínas mais energeticamente exigentes de sintetizar (Rothman *et al.*, 2002).

1.4 Simulação da Digestão (Digestão *in vitro*)

Sendo a digestão no organismo um fenómeno complexo que implica ingestão, hidrólise, absorção, secreção e trânsito, torna-se difícil estudar tal acontecimento *in vivo* e determinar a digestibilidade dos produtos alimentares, visto haver várias interacções entre os diferentes processos que ocorrem. Assim, nos últimos anos, têm sido desenvolvidos diversos métodos de digestão *in vitro*, que permitem estudar mudanças estruturais, digestibilidade alimentar e libertação de componentes alimentares sob condições simuladas, fornecendo uma alternativa aos ensaios de digestão *in vivo* que, apesar de bastante precisos, são dispendiosos, demorados e têm diversas restrições éticas (Papadopoulos e Frazier, 2004; Wilfart *et al.*, 2008; Hur *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2012). A maioria dos ensaios *in vitro* baseia-se na fisiologia do tracto gastrointestinal,

simulando as condições de parte da digestão humana e recorrendo, para isso, a soluções artificiais que simulem o meio de cada compartimento digestivo. Contudo, os resultados obtidos com os modelos *in vitro* são muitas vezes distintos dos que se obtêm com modelos *in vivo*, maioritariamente devido às dificuldades em simular com precisão os processos físico-químicos e fisiológicos altamente complexos que ocorrem (Hur *et al.*, 2011). Estes modelos terão de ser bastante dinâmicos e ter em conta diversos aspectos (a actividade enzimática, a composição iónica, os *stresses* mecânicos, o tempo de digestão, o pH da amostra e do meio digestivo, entre outros), tentando mimetizar ao máximo o que se passa *in vivo*, sabendo-se já que, normalmente, *in vitro* os processos se dão bem mais facilmente (Wilfart *et al.*, 2008; Hur *et al.*, 2011), sendo necessário então um compromisso entre a precisão e a facilidade de utilização do modelo *in vitro* em questão (Hur *et al.*, 2011).

Os vários modelos de digestão *in vitro* variam consoante o componente alimentar a analisar, a natureza da matriz alimentar e a sofisticação do próprio modelo, podendo variar no número e tipo de passos incluídos na digestão, na composição dos fluídos digestivos utilizados em cada estágio, nos *stresses* mecânicos, entre outros. As enzimas poderão ter uma origem humana, animal ou vegetal, sendo que a maioria dos estudos recorrem a enzimas provenientes de animais omnívoros ou de voluntários humanos, sendo depois adicionadas sequencialmente, na tentativa de simular mais verdadeiramente o processo digestivo. É necessário ter em atenção não só que as enzimas podem necessitar de componentes adicionais constituintes dos fluídos digestivos para que possam actuar com eficiência como também que a sua actividade pode decrescer ao longo do tempo, sendo essencial a utilização de preparações enzimáticas frescas (Hur *et al.*, 2011). O uso de enzimas purificadas (em detrimento de misturas biológicas complexas) é vantajoso, pois a comparação de resultados entre laboratórios é mais consistente e facilita a *standartização* dos modelos. Apesar disso, a digestão de um nutriente é, muitas vezes, influenciada pela digestão de outros, ficando o ensaio mais realista se se recorrer a uma mistura enzimática. Os modelos de digestão *in vitro* processam-se a uma temperatura de 37 °C e o tempo de digestão deverá mimetizar o que se passa no organismo *in vivo*, sendo a natureza e tamanho da amostra testada os factores que mais influenciam a duração da mesma (Giori, 2010; Hur *et al.*, 2011).

1.5 Alimentos Funcionais

Graças à cada vez maior divulgação da relação entre a alimentação e a saúde e à crescente preocupação dos indivíduos com o corpo, o cuidado das sociedades ocidentais desenvolvidas com a ingestão alimentar tem aumentado de forma exponencial e, por isso, as indústrias alimentares investem cada vez mais na pesquisa, desenvolvimento e *marketing* de novos produtos, apresentados com o objectivo de promover a saúde (Anjo, 2004). A dieta alimentar humana deveria reunir todas as substâncias nutritivas essenciais ao bom funcionamento do organismo e à manutenção de um estado fisiológico saudável, mas o estilo de vida moderno das sociedades mais desenvolvidas, aliado à falta de tempo, *stress* e hábitos alimentares

nutricionalmente incompletos dificultam a conservação desse equilíbrio dietético, contribuindo também para o avanço de doenças crónicas degenerativas. Assim, os alimentos naturalmente enriquecidos nutricionalmente poderão ser uma mais-valia no reforço dietético, sem necessidade de recorrer a suplementos (Lidon e Silvestre, 2010). Estes, embora não possam ser considerados como produtos que curam doenças, fornecem substâncias protectoras, nutritivas e/ou benéficas, contêm os nutrientes diários necessários ao organismo e/ou ajudam a controlar o avanço das doenças degenerativas já referidas, prevenindo ou reduzindo o seu risco. Além disso, não apresentam contra-indicações, podendo ser consumidos sem prescrição médica (Lidon e Silvestre, 2010). Dentro dos alimentos enriquecidos, estão inseridos os alimentos funcionais que, além de possuírem as funções nutricionais básicas, quando consumidos como parte da dieta habitual produzem efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos para a saúde física dos consumidores (crescimento, desenvolvimento e manutenção das funções normais) e para a redução dos riscos de doenças crónicas, sendo seguros para consumo sem supervisão médica, confirmando-se que os efeitos positivos são obtidos com quantidades não tóxicas do mesmo, desde que ingeridos em doses fisiologicamente equilibradas, exercendo os seus efeitos mesmo após a suspensão da ingestão (Anjo, 2004; Lamarão e Fialho, 2009; Lidon e Silvestre, 2010).

Actualmente, a atenção dada aos compostos fenólicos, graças aos seus efeitos benéficos na saúde, relacionados com as suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, cardio- e neuro-protectoras e quimio-preventivas, introduz os alimentos ricos em compostos fenólicos na lista de alimentos saudáveis, considerando-os alimentos funcionais pelas suas características promotoras de saúde e preventivas de doenças (Landete, 2012). A determinação da capacidade antioxidante de bebidas poderá ser das mais importantes em termos alimentares, de um ponto de vista nutricional, pois está estabelecido que são as bebidas o produto alimentar que mais contribui para a capacidade antioxidante total numa dieta completa, como a dieta mediterrânica, pois os compostos estão, de uma maneira geral, mais biodisponíveis do que o estão em alimentos sólidos (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Exemplos destas bebidas ricas em compostos com actividade antioxidante são, entre outras, o vinho tinto, o chá, o café, os sumos de fruta e as infusões de plantas medicinais.

1.6 Infusões de Plantas Medicinais

A utilização popular de plantas medicinais baseia-se em saberes antigos transmitidos de geração em geração, sendo uma fonte inesgotável de informação com centenas de anos de experiência adquirida através de conhecimentos empíricos sem parecer científico (Martins, 2011). Estas mesmas plantas constituem a principal forma de resposta às necessidades de cuidados de saúde nos países menos desenvolvidos, que representam cerca de 65% da população mundial, baseando-se a sua utilização ainda no conhecimento tradicional das suas acções devido à inexistência de um suporte científico para a actividade que lhes é atribuída (Valentão, 2002). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam para que cerca de 80% da população

mundial recorra à fitoterapia para tratar problemas de saúde e, pelo menos, 30% desse total o faça por indicação médica (Martins, 2011).

A bebida que é o chá consiste no produto de processamento de espécies vegetais por meio de infusão, ou seja, através da submersão de plantas secas em água a ferver (Chan *et al.*, 2010; Moraes-de-Souza *et al.*, 2011) e teve a sua primeira produção na China, há cerca de 5000 anos, sendo desde aí considerado um produto terapêutico para muitas doenças e infecções. Foi difundido pelo mundo, tendo sido introduzido na Europa no século XVII (Petisca, 2008) e actualmente, de entre os vários alimentos funcionais, é uma bebida amplamente consumida (por cerca de dois terços da população mundial, com um consumo mundial *per capita* de 120 mL/dia), sendo a mais consumida no mundo a seguir à água (Henning *et al.*, 2003; Lamarão e Fialho, 2009). O elevado consumo do chá prende-se não só pelo seu aroma atractivo e gosto singular mas também pelo interesse nas suas propriedades potencialmente promotoras de saúde, visto que diversos estudos epidemiológicos relacionam o seu consumo com uma redução do risco de doenças (cardiovasculares, diabetes, níveis de colesterol elevados, osteoporose), entre outros benefícios (Horzic *et al.*, 2009).

Apesar de todos os extractos aquosos serem, tradicionalmente, designados por “chás”, apenas os chás branco, verde, oolong e preto deveriam ser assim designados, pois apenas estes são provenientes de infusões da planta do chá, *Camellia sinensis*. Os outros extractos aquosos, provenientes de outras plantas, deveriam designar-se “tisanas”. Comparativamente aos extractos de *C. sinensis*, as tisanas contêm valores de actividade antioxidante, fenóis e flavonóides totais bastante inferiores (Horzic *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2010), sendo a literatura referente aos seus efeitos benéficos na saúde muito mais limitada que no primeiro caso (McKay e Blumberg, 2006). Pensa-se que as propriedades antioxidantes superiores das infusões de *C. sinensis* se devam ao seu elevado conteúdo em flavanóis, nomeadamente quatro derivados do grupo das catequinas, epigallocatequina galato, epigallocatequina, galocatequina e epicatequina, praticamente ausentes nas tisanas de ervas (Henning *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2010). Os níveis de compostos fenólicos no organismo são geralmente baixos, logo, a ingestão de chá deverá ocorrer numa dieta fraccionada (várias vezes ao dia), para que possa proporcionar um efeito benéfico, devendo ser consumido entre refeições, para não interferir na biodisponibilidade de nutrientes provenientes da ingestão alimentar (Lamarão e Fialho, 2009).

Já considerando uma determinada planta, a composição química das diferentes partes da qual se pretende fazer a infusão (folhas, flores, raízes), especialmente no que toca a metabolitos secundários, depende de uma diversidade de factores, nomeadamente, estação do ano, clima e condições meteorológicas, vegetação dominante, tipo de solo, controlo e modificação genética, exposição a microrganismos, insectos e outros herbívoros, processos utilizados na horticultura, tipo e idade da planta, altura da colheita, entre outros (Miliauskas *et al.*, 2004; Lamarão e Fialho, 2009; Srivastava e Gupta, 2009; Afonso, 2010; Martins, 2011).

Em Portugal, para além do chá, existem infusões de outras plantas que são correntemente consumidas. Dentro dessas infusões de consumo comum encontram-se a infusão de flor de camomila e a de flor de laranjeira, estudadas no presente trabalho.

1.6.1. Flor de Camomila (*Matricaria chamomilla* L.)

A camomila pode ser designada por diferentes nomes científicos que são sinónimos. Assim pode designar-se por *Matricaria chamomilla* L. (McKay e Blumberg, 2006; Harbourne *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2011), *Chamomilla recutita* L. ou *Matricaria recutita* L. Rauschert (McKay e Blumberg, 2006; Nováková *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011; Raal *et al.*, 2012). Também em relação aos nomes comuns, esta planta pode designar-se apenas por camomila, por camomila alemã (McKay e Blumberg, 2006; Singh *et al.*, 2011; Raal *et al.*, 2012), camomila húngara ou camomila-selvagem (McKay e Blumberg, 2006; Singh *et al.*, 2011).

É uma planta herbácea anual nativa da Europa e Ásia Ocidental (McKay e Blumberg, 2006; Harbourne *et al.*, 2009), cujas flores (Figura 1.6A) fortemente aromáticas e de sabor amargo (Srivastava e Gupta, 2009), são utilizadas numa grande variedade de produtos, sendo das mais comuns para fins curativos e das plantas medicinais mais cultivadas no mundo, com uma produção anual correspondente a vários milhares de toneladas (Srivastava *et al.*, 2010; Raal *et al.*, 2012).



(A)



(B)

Figura 1.6 – (A) Exemplar de flor de camomila (*Matricaria chamomilla* L.) (retirado de www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/camomila/camomila.php) e **(B)** inflorescências da mesma após secagem (retirado de www.teatower.com/en/plants/1091-camomile-matricaria-recutita.html).

Comummente aplicada em infusões de ervas, a camomila está relacionada com o consumo de mais de um milhão de chávenas de infusão por dia (Srivastava e Gupta, 2009; Raal *et al.*, 2012), sendo as cabeças das flores após secagem a parte mais utilizada da planta (Pereira *et al.*, 2009). Em forma de pó, pode ser aplicada externamente em contusões, queimaduras, erupções

cutâneas, hemorroidas e infecções da boca, garganta e olhos (Singh *et al.*, 2011; Srivastava *et al.*, 2010). O óleo essencial extraído da mesma, que representa 0,24 a 1,9% da sua composição, é constituído por compostos voláteis que incluem, maioritariamente, terpenóides (azuleno, camazuleno, derivados de acetileno, α -bisabolol e os seus óxidos) (McKay e Blumberg, 2006; Srivastava e Gupta, 2009; Nováková *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2010), sendo utilizado tanto para fins farmacêuticos como em perfumaria, cosméticos, aromaterapia e na área da indústria alimentar (Singh *et al.*, 2011). No entanto, apenas cerca de 5 a 7% da constituição total do óleo essencial acaba por fazer parte da constituição dos extractos aquosos, devido à relativa insolubilidade do mesmo em meio aquoso (Srivastava e Gupta, 2009). Esta planta também se encontra listada como uma fonte natural de aromatizante alimentar, reconhecida como segura (Singh *et al.*, 2011; Raal *et al.*, 2012). Embora o seu pólen possa causar reacções alérgicas a uma percentagem relativamente baixa de pessoas (Singh *et al.*, 2011; Srivastava *et al.*, 2010; Raal *et al.*, 2012) e a segurança em crianças, grávidas, mulheres em amamentação, doentes renais ou hepáticos não tenha sido estabelecida, não existem quaisquer relatos credíveis de toxicidade causada pela mesma (Srivastava *et al.*, 2010).

A camomila costuma também ser utilizada para aliviar constipações comuns (Nováková *et al.*, 2010), úlceras (Srivastava e Gupta, 2009; Raal *et al.*, 2012), inflamações do tracto urinário, distúrbios menstruais e, numa concentração mais diluída, como um sonífero suave, aplicado em crianças (Singh *et al.*, 2011; Raal *et al.*, 2012), podendo ser também utilizada para acalmar os nervos e reduzir a ansiedade, tratar histeria, convulsões, pesadelos, insónias e outros problemas do sono (Morais *et al.*, 2009; Srivastava e Gupta, 2009; Hosseini *et al.*, 2011). Consumida durante a refeição, em infusão, pode contribuir para a prevenção da progressão de hiperglicemia e complicações diabéticas (Srivastava *et al.*, 2010; Raal *et al.*, 2012). Em termos digestivos, é recomendada no alívio de diversos distúrbios gastrointestinais como flatulência, indigestão, diarreia, cólicas, anorexia, náusea e vómitos (Morais *et al.*, 2009; Srivastava e Gupta, 2009; Srivastava *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011).

Tradicionalmente, a inflorescência seca desta planta (Figura 1.6B) é usada como uma preparação medicinal e farmacêutica, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antiespasmódicas, antipiréticas, analgésicas, antialérgicas, antibacterianas e antifúngicas, sedativas, sudoríferas e antioxidantes (Harbourne *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2009; Srivastava e Gupta, 2009; Nováková *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011). Algumas destas propriedades foram comprovadas recentemente por estudos científicos que as atribuem em certa parte ao seu conteúdo fenólico (Harbourne *et al.*, 2009; Srivastava *et al.*, 2010) e, por isso, conferem à planta um grande interesse económico (Nováková *et al.*, 2010), apesar de os mecanismos envolvidos nas mesmas ainda não estarem esclarecidos (Pereira *et al.*, 2009).

A flor de camomila possui cerca de 120 constituintes químicos identificados como metabolitos secundários com potencial actividade farmacológica (Singh *et al.*, 2011; Srivastava *et al.*, 2010). O seu conteúdo em compostos fenólicos bioactivos consiste maioritariamente em **flavonóides**, como os flavonóis e as flavonas, que incluem a quercetina, rutina e patuletina,

isorhamnetina, apigenina e luteolina, assim como a naringenina (flavanona), **ácidos fenólicos**, como os ácidos cafeico, clorogénico, vanílico, anísico, siringico, ferúlico e dicafeoilquínicos, e **cumarinas**, como a umbeliferona e herniarina (McKay e Blumberg, 2006; Harbourne *et al.*, 2009; Nováková *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011; Raal *et al.*, 2012).

A apigenina-7-glucósido (uma flavona glicosilada) é um dos principais flavonóides presentes nas flores de camomila (Harbourne *et al.*, 2009; Srivastava e Gupta, 2009; Nováková *et al.*, 2010; Raal *et al.*, 2012), devendo existir nas mesmas num mínimo de 0,25% (Raal *et al.*, 2012). A apigenina, que, na sua forma livre, está presente na camomila em muito baixa concentração, mas que pode ser libertada durante o processamento da infusão ou durante a digestão gastrointestinal, parece ser o principal composto responsável pela actividade anticancerígena dos extractos desta planta. Com efeito, estudos recentes sugerem que extractos da camomila possam exercer uma actividade antiproliferativa e apoptótica em células humanas tumorais, exercendo efeitos mínimos em células não tumorais (Srivastava e Gupta, 2009; Srivastava *et al.*, 2010).

Em condições normais, a maior fracção de flavonóides ocorre na forma de glicósidos altamente estáveis e solúveis em água (Srivastava e Gupta, 2009; Nováková *et al.*, 2010) enquanto os flavonóides na forma de agliconas são encontrados em grande variedade entre os componentes lipofílicos (Nováková *et al.*, 2010). No entanto os teores dos constituintes de cada planta individual, bem como a composição de cada infusão, podem variar bastante visto serem dependentes de uma grande diversidade de factores, que incluem o processo de secagem, de preparação e armazenamento da planta, bem como da técnica de extracção (Nováková *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011; Raal *et al.*, 2012). Em relação a este último parâmetro, estudos efectuados com a infusão de camomila permitem afirmar que o seu conteúdo em ácidos fenólicos específicos varia consoante a temperatura de extracção (Horzic *et al.*, 2009). Por outro lado, a luz não parece exercer efeitos significativos na degradação fenólica e o armazenamento a -20 °C não causa degradação significativa do conteúdo em flavonóides (Srivastava e Gupta, 2009).

Estudos prévios realizados por três grupos de investigação distintos evidenciam a existência de um baixo teor de fenólicos totais para esta infusão (Moraes-de-Souza *et al.*, 2011), quando comparada com outras, mostrando que a camomila é uma planta com propriedades antioxidantes relativamente baixas (Miliauskas *et al.*, 2004; McKay e Blumberg, 2006). No entanto, é impossível chegar a um verdadeiro consenso sobre qual o valor real, pois além da complexidade e sinergismo existente na acção fenólica, o facto de não haver padronização nos métodos torna inexequível uma comparação fiável. A variabilidade de resultados pode ser confirmada através da observação da Tabela 1.1 onde se apresentam os valores de fenóis, flavonóides e flavonóis totais bem como valores de actividade antioxidante detectada por diferentes ensaios *in vitro* obtidos por diferentes autores para extractos de camomila.

Tabela 1.1 – Análise da infusão de flor de camomila através de diferentes ensaios por diferentes grupos de investigadores.

Teste	Resultado	Unidades	Observações	Referência Bibliográfica
Conteúdo Fenólico Total (Ensaio Folin-Ciocalteu)	7,5 ± 0,1	mg EAG/g de planta	extracto metanólico	Miliauskas <i>et al.</i> , 2004
	106 ± 0,37	mg EAG/chávena de chá (240 mL)	-	Atoui <i>et al.</i> , 2005
	33,83 ± 0,75	mg de EAG/g de planta	extracto aquoso	Dudonné <i>et al.</i> , 2009
	389,65 ± 99,15	nmol de EAG/g de planta	extracto aquoso	Pereira <i>et al.</i> , 2009
	1370 ± 37	mg EAG/100 g de chá em pó	-	Chan <i>et al.</i> , 2010
Ensaio DPPH (CI₅₀)	47,41	mg/mL	concentração efectiva que inibe em 50% o teor do radical livre	Morais <i>et al.</i> , 2009
	32,9 ± 1,2	µg/mL		Pereira <i>et al.</i> , 2009
Ensaio DPPH	6,4 ± 1,7	%	extracto de etil-acetato	Miliauskas <i>et al.</i> , 2004
	8,2 ± 1,1		extracto de acetona	
	44,7 ± 2,6		extracto metanólico	
	0,67 ± 0,38		extracto aquoso	Dudonné <i>et al.</i> , 2009
	69,57 ± 3,7		extracto aquoso	Horzic <i>et al.</i> , 2009
Conteúdo Flavonóides Total	7,1 ± 0,4	mg ER/g de planta	extracto metanólico	Miliauskas <i>et al.</i> , 2004
Conteúdo Flavonóis Total	0,5 ± 0,1	mg ER/g de planta	extracto metanólico	Miliauskas <i>et al.</i> , 2004
Ensaio ORAC	588 ± 29	µmol trolox/g de extracto planta	-	Dudonné <i>et al.</i> , 2009
Ensaio FRAP	17,7	mmol/100g	capacidade de redução férrica do plasma	McKay e Blumberg, 2006
	8,1 ± 0,2	mg EAG/g de chá em pó		Chan <i>et al.</i> , 2010
Ensaio ABTS	0,72 ± 0,07	mmol /L de trolox	extracto aquoso	Horzic <i>et al.</i> , 2009
Capacidade de Quelação do Ferro (CI₅₀)	3,3 ± 0,1	mg/mL	concentração de extracto eficaz na quelação de 50% dos iões de ferro	Chan <i>et al.</i> , 2010

DPPH – Capacidade de desactivar o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila; ORAC – Capacidade de desactivar o radical peróxido; FRAP – Capacidade redutora; ABTS – Capacidade de desactivar o radical catião do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico; EAG – Equivalentes de ácido gálico; ER – Equivalentes de rutina.

1.6.2. Flor de Laranjeira (*Citrus aurantium*)

A *Citrus aurantium*, conhecida comumente por laranjeira de Sevilha ou laranjeira-azeda (Fugh-Berman e Myers, 2004) é uma árvore cítrica de pequeno porte, com folha perene, originária da Índia e largamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais, nomeadamente na região mediterrânica, sendo utilizada tanto na alimentação como na medicina tradicional (Fugh-Berman e Myers, 2004; Selecções Reader's Digest, 2006; Mencherini *et al.*, 2012).

Os seus frutos frescos podem ser usados como condimento e o seu consumo resulta em perda de peso e termogénese, sendo sugerida tradicionalmente no tratamento da ansiedade, insónias e convulsões. Quando secos, ajudam no alívio de problemas digestivos. A sua casca é usada para fazer marmelada e seca auxilia na estimulação do apetite e da digestão, sendo constituinte comum de remédios gastrointestinais. As suas folhas possuem efeitos hipnóticos, anticonvulsivos, antipiréticos, tónicos e ansiolíticos (Hosseini *et al.*, 2011; Mencherini *et al.*, 2012).

As suas flores (Figura 1.7A), de cor branca e perfume adocicado (Fugh-Berman e Myers, 2004; Selecções Reader's Digest, 2006; Hosseini *et al.*, 2011), são tradicionalmente utilizadas depois de secas (Figura 1.7B) em infusões, sendo aplicadas no alívio de distúrbios digestivos pelas suas propriedades antiespasmódicas, na redução do catarro pelas propriedades expectorantes, no tratamento de estados de nervosismo, alterações de sono passageiras e como sedativo leve pela sua acção depressiva no sistema nervoso central, confirmada por estudos experimentais (Fugh-Berman e Myers, 2004; Hosseini *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012), no alívio da flatulência e dos sintomas menopáusicos (Lu *et al.*, 2006) e, mais recentemente, como componente principal para perda de peso, embora sem evidências científicas suficientes (Fugh-Berman e Myers, 2004).



Figura 1.7 – (A) Flores e frutos de laranjeira-azeda (*Citrus aurantium*)

(clinicadue2.blogspot.pt/2012/04/afine-silhueta-e-tenha-mais-disposicao.html) e **(B)** inflorescências da mesma após secagem (teatower.com/en/plants/1103-orange-blossoms-citrus-aurantium.html).

O óleo essencial proveniente das flores de laranjeira (designado por *neroli*) é utilizado em perfumes, licores e água de flor de laranja (aromatizante para doces) (Fugh-Berman e Myers, 2004; Yang *et al.*, 2010; Hosseini *et al.*, 2011). Nenhum dos constituintes produz efeitos secundários conhecidos, estando empiricamente provado que não têm efeitos de toxicidade, pois a ingestão de produtos cítricos é bastante regular e feita desde há muitos séculos (Jung *et al.*, 2006; Selecções Reader's Digest, 2006).

A maioria dos estudos existentes até à data refere-se à constituição fenólica das plantas do género *Citrus* em geral, não fazendo distinção entre as diferentes espécies híbridas que são consumidas. Além disso, os estudos feitos nas flores de *Citrus* são também bastante escassos, não só relativamente à sua composição química como à comprovação dos efeitos benéficos na saúde que lhe são atribuídos (Yang *et al.*, 2010), havendo muito mais estudos relativos ao fruto cítrico e à sua casca. Os níveis relativos das moléculas fenólicas são altamente característicos de um determinado órgão da planta, dependem da origem genética, tempo de maturação e diferentes partes constituintes (folha, fruto, flor, casca, parte edível, entre outros) (Lu *et al.*, 2006) e são

marcadamente afectados pelo estágio de maturação em que o mesmo órgão se encontra, havendo uma maior concentração nos tecidos mais jovens, que pode estar relacionado com a protecção contra insectos e organismos patogénicos (Castillo *et al.*, 1992).

Muitos investigadores confirmam a existência de actividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, proveniente das flavonas e do óleo essencial da flor de *Citrus aurantium*. No entanto, a separação, identificação e quantificação dos seus componentes significativos ainda está na sua fase inicial (Zhao *et al.*, 2012). Em termos de conteúdo em compostos fenólicos sabe-se que a flor de laranja-azedo possui **flavonóides**, nomeadamente as flavanonas glicosiladas naringina, hesperidina e neo-hesperidina (Castillo *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 2010; Hosseini *et al.*, 2011), sugerindo que estes sejam responsáveis pela maioria das suas propriedades farmacológicas (Hosseini *et al.*, 2011).

1.7 Efeito da simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal nos compostos fenólicos

Actualmente, existem bastantes estudos sobre a capacidade antioxidante de diversos produtos alimentares e sua respectiva constituição em compostos fenólicos. No entanto, existem relativamente poucos estudos a analisar os mesmos parâmetros após o processo de digestão, principalmente no que diz respeito a chás e infusões, onde apenas uma minoria já foi analisada, como no caso dos chás verde (Record e Lane, 2001; Green *et al.*, 2007) e preto (Record e Lane, 2001) e das infusões de agrimónia, salva, framboesa, segurelha-de-inverno (Gião *et al.*, 2012), boldo-de-jardim (Porfírio *et al.*, 2010), alcaparra e funcho-do-mar (Siracusa *et al.*, 2011).

Estes estudos têm demonstrado que a sensibilidade dos compostos fenólicos às condições da digestão gastrointestinal varia consoante a sua estrutura. Assim, em ensaios utilizando infusões de alcaparra (*Capparis spinosa* L.) e erva-doce do mar (*Crithmum maritimum* L.) verificou-se que o teor em compostos fenólicos totais, assim como a actividade antioxidante dos extractos diminuía significativamente nas infusões sujeitas a digestão, sugerindo que os compostos fenólicos dominantes presentes nas amostras não digeridas não fossem estáveis nas condições gastrointestinais aplicadas. Os autores apontaram que as alterações verificadas ao nível dos compostos fenólicos estariam, essencialmente, relacionadas com o pH do meio, visto alguns destes compostos parecerem ser sensíveis às condições ligeiramente alcalinas do intestino delgado, podendo estas conduzir a alterações estruturais que comprometam a sua actividade antioxidante (Siracusa *et al.*, 2011). Os autores referem, igualmente, a possibilidade de durante a incubação pancreática poderem ocorrer reacções de isomerização do ácido clorogénico, que levassem à diminuição da actividade antioxidante total dos extractos (Siracusa *et al.*, 2011).

Por outro lado, em ensaios realizados com infusões de chá verde e preto verificou-se que enquanto alguns compostos, tais como o ácido gálico, não sofreram qualquer alteração após as

condições aplicadas, outros, como a epigallocatequina, diminuíram ligeiramente. No entanto, a actividade antioxidante dos chás em estudo diminuiu cerca de 28% e a concentração global de polifenóis diminuiu cerca de 32% (Record e Lane, 2001). Também Porfírio e colaboradores (2010) e Gião e colaboradores (2012), estudando o perfil fenólico de diferentes infusões de plantas antes e após a simulação da digestão gastrointestinal, verificaram que, dependendo dos compostos em causa, as perdas podiam ir do negligenciável até uma degradação quase total. Assim, enquanto as catequinas parecem resistir ao processo digestivo podendo, eventualmente, ser absorvidas a nível sistémico, os ácidos rosmarínico e clorogénico parecem sofrer perdas acentuadas ao longo da digestão (Gião *et al.*, 2012). Também estudos efectuados com inflorescências de brócolo evidenciaram que os flavonóides possam ser severamente afectados pelas condições gastrointestinais (Vallejo *et al.*, 2004). As alterações verificadas no perfil fenólico da infusão de boldo-de-jardim, após a simulação *in vitro* da digestão, traduziram-se numa redução em cerca de 50% da sua actividade antioxidante (Porfírio *et al.*, 2010).

Em ensaios realizados com extractos de amoras foi possível verificar que, embora o teor em antocianidinas diminua bastante após digestão intestinal, a actividade antioxidante mantém-se elevada, sugerindo que os compostos fenólicos gerados a partir da degradação das antocianidinas em ambiente intestinal possuam, igualmente, actividade antioxidante (Liang *et al.*, 2012). Ensaios realizados em sumos de vegetais mostraram resultados contraditórios. Assim, enquanto uns mostram que a actividade antioxidante destes é relativamente estável ao longo do processo digestivo outros mostram decréscimos na actividade antioxidante total após a digestão (Wootton-Beard *et al.*, 2011).

1.8 Objectivos

Conforme já referido anteriormente, diversos trabalhos têm vindo a demonstrar a presença, nas infusões de flor de camomila e de flor de laranjeira-azeda, duas infusões de consumo corrente em Portugal, de compostos com elevado potencial antioxidante. Contudo, a maioria destes estudos baseia-se em ensaios *in vitro*, sendo que a extrapolação desses resultados para a situação *in vivo* não pode ser imediata. Com efeito, o facto de um composto apresentar uma determinada actividade *in vitro* não é condição necessária e suficiente para que a mantenha nas condições fisiologias. Para que isso aconteça é necessário que ele resista ao processo de digestão gastrointestinal, que seja absorvido pelas células do intestino e que não seja rapidamente inactivado pelas bactérias da flora intestinal nem pelas enzimas de biotransformação humanas.

1.8.1 Objectivo Geral

Neste contexto, o estudo apresentado teve como objectivo geral proceder à determinação do efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* na capacidade antioxidante presente nas amostras em estudo: infusão de flor de camomila e infusão de flor de laranjeira-azeda.

1.8.2 Objectivos Específicos

Os objectivos específicos do estudo apresentado foram:

1. Elaborar uma digestão *in vitro* das infusões de flor de camomila e de flor de laranjeira-azeda previamente preparadas;
2. Quantificar os compostos fenólicos e flavonóides totais antes e após a simulação da digestão gastrointestinal;
3. Determinar a capacidade antioxidante antes e após a simulação da digestão gastrointestinal, de modo a aferir qual o impacte do processo digestivo nas propriedades bioactivas das duas infusões. Não havendo nenhum método padrão validado que possa avaliar todos os possíveis mecanismos de actividade antioxidante, esta foi avaliada através da conjugação de diversos dos métodos existentes, cada um deles com um diferente *endpoint*: capacidade de redução do cobre; capacidade de sequestro dos radicais anião superóxido e hidroxilo e capacidade de quelação de ferro.
4. Comparar as diferentes amostras entre si relativamente à sua capacidade antioxidante e ao conteúdo em compostos fenólicos e, em particular, em flavonóides.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2.1. Caracterização das Infusões das Plantas Medicinais

Na realização deste trabalho foram avaliadas duas infusões de plantas medicinais: flor de camomila (*Matricaria chamomilla* L.) e de laranjeira-azeda (*Citrus aurantium*). O material vegetal utilizado na realização das infusões foi adquirido comercialmente em lojas de produtos naturais.

2.1.1. Infusão de Flor de Camomila

A infusão de flor de camomila, preparada a partir de material vegetal seco constituído pela parte floral da planta, é caracterizada por uma cor castanho-amarelada e um aroma doce e intenso (Figura 2.1).



Figura 2.1 – Aspecto físico da flor de camomila e da respectiva infusão.

2.1.2. Infusão de Flor de Laranjeira

A infusão de flor de laranjeira, preparada a partir de material vegetal seco constituído pela parte floral da planta, é caracterizada por uma cor castanho-escura e um aroma doce e suave (Figura 2.2).



Figura 2.2 – Aspecto físico da flor de laranjeira-azeda e da respectiva infusão.

2.2. Reagentes e Enzimas

Na elaboração de todo o trabalho experimental foram utilizados os seguintes reagentes e enzimas: acetato de amónio (Riedel-de Haën, 98%), ácido acético (Panreac, 99%), ácido L(+)-ascórbico (Panreac, 99%), ácido clorídrico (Panreac, 37%), ácido gálico monohidratado (Merck, 99,5%), ácido tiobarbitúrico (TBA) (Acros, 98%), ácido tricloroacético (Riedel-de Haën, 99,5%), álcool etílico (Riedel-de Haën, 99%), azul de nitrotetrazólio (NBT²⁺) (Sigma), bicarbonato de sódio (Panreac, 99%), bílis bovina desidratada (Sigma B3883), carbonato de sódio (VReis), cloreto de cobre (II) bihidratado (Riedel-de Haën, 99%), cloreto de sódio (Panreac, 99,5%), cloreto de alumínio (Fluka, 99%), cloreto férrico hexahidratado (Merck, 99%), desoxirribose (Sigma, 99%), dihidrogenofosfato de potássio (Merck, 99,5%), dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida (NADH) (Sigma, 97%), ferrozina (Sigma), hidrogenofosfato de dipotássio (BDH Chemicals Lda, 97,5%), hidróxido de sódio (Merck, 99%), metossulfato de fenazina (PMS) (Sigma, 90%), neocuproína (Sigma), pancreatina de pâncreas de porco (Sigma P3292), pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma, P7125, Lote 030M15711V), peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (Panreac, 30%), quercetina (Sigma), reagente de Folin-Ciocalteu (Panreac), sal dissódico de ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) (Panreac, 99%), sulfato ferroso heptahidratado (Riedel-de Haën, 99). Na preparação de todas as soluções e diluições utilizou-se sempre água ultra-pura, captada a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Molsheim, França).

2.3. Preparação das Amostras

2.3.1. Preparação das Infusões Medicinais

O procedimento de preparação das infusões medicinais foi adaptado do método descrito por Henning e colaboradores (2003). Para cada amostra em triplicado, foi adicionado num copo de vidro 100 mL de água ultra-pura fria a 5 g de material vegetal que depois foi coberto com um vidro de relógio e colocado a aquecer em placa de aquecimento sob agitação magnética. No momento em que a preparação entrou em ebulição, deixou-se ferver durante 3 minutos e, terminado esse tempo, retirou-se a mesma do aquecimento, permanecendo durante 15 minutos sob agitação magnética em placa fria. Findo esse tempo, as infusões foram passadas por um passador, prensadas e, reunido o volume dos triplicados num único copo de vidro, foi-lhe aplicada filtração a vácuo, através de um filtro de papel (Whatman n.º 1).

2.3.2. Elaboração da Digestão *in vitro*

O procedimento de digestão realizado, que tenta mimetizar a situação fisiológica do organismo humano no estômago e intestino, foi adaptado a partir de um método já publicado (Gião *et al.*, 2012), com algumas modificações. O volume final de cada infusão foi dividido igualmente

por 3 frascos de vidro tipo Schott, sendo um dos frascos embrulhado em papel de alumínio e colocado no frio (amostra não digerida) e os outros dois submetidos a uma digestão gástrica (duplicados), com acerto do seu pH a 2,0 recorrendo a HCl 1 N e junção de 0,05 mL de solução de pepsina (25 mg/mL em HCl 0,1 N) por mL de amostra. Seguidamente, as amostras foram embrulhadas em papel de alumínio e incubadas em banho a 37 °C durante duas horas, com uma agitação de 100 rpm. Findo o tempo de incubação, os digeridos gástricos foram submetidos a uma digestão intestinal, com acerto do seu pH a 6,0 recorrendo a NaHCO₃ 1 M e junção de 0,25 mL de solução mista de pancreatina e sais biliares (2 g/L de pancreatina e 12 g/L de bÍlis bovina em NaHCO₃ 0,1 M) por mL de amostra. As amostras, ainda embrulhadas em papel de alumínio, foram incubadas em banho a 37 °C durante uma hora, com uma agitação de 45 rpm. Após determinação do volume final das amostras digeridas e de qual o frasco com maior volume, acrescentou-se água ultra-pura a todos os outros frascos (amostras não digeridas e digeridas), para que ficassem todos com o mesmo volume final. Todas as amostras sofreram um processo de inactivação enzimática por choque térmico através de submersão em água a 100 °C durante 4 minutos, seguida de arrefecimento por armazenamento em gelo durante 10 minutos. Findo este tempo, as amostras foram novamente filtradas a vácuo, através de um filtro de papel (Whatman n.º 1) e depois por membrana estéril (Millipore Millex GP) com poro de 0,22 µm, sendo aliqüotadas em microtubos tipo Eppendorf estéreis (cerca de 1,5 mL de amostra por cada microtubo) e armazenadas em caixas a -60 °C. Paralelamente à digestão das amostras realizou-se um ensaio controlo, em que se substituiu a amostra por igual volume de água ultra-pura, tendo o restante procedimento sido exactamente igual ao anteriormente descrito para as infusões.

2.4. Determinação do Conteúdo em Compostos Fenólicos Totais

2.4.1. Princípio do Método

A quantificação dos compostos fenólicos totais presentes nas amostras em estudo foi realizada através do ensaio colorimétrico de Folin-Ciocalteu, um método operacionalmente simples, sensível e reprodutível (Prior *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2008), cujo mecanismo básico consiste numa reacção de oxidação-redução que se baseia na transferência de electrões (SET) pela redução do heteropolianião molibdotungstênio-fosfórico, complexo presente no reagente de Folin-Ciocalteu (com uma cor amarela intensa devido à presença de moléculas não reduzidas) e pela oxidação do ião fenolato (forma em que os compostos fenólicos se encontram na amostra para facilitar a reacção), produzindo uma mistura de óxidos de tungsténio e molibdénio com coloração azul (moléculas reduzidas), que absorve a um comprimento de onda de 750-765 nm, permitindo a quantificação de compostos redutores, pois a intensidade da coloração desenvolvida é proporcional ao teor fenólico (Valentão, 2002; Prior *et al.*, 2005; Apak *et al.*, 2007; Magalhães *et al.*, 2008; Moraes-de-Souza *et al.*, 2011). A reacção ocorre em meio alcalino, obtido pela adição de carbonato de sódio em solução saturada (Angelo e Jorge, 2007). O ácido gálico é utilizado como

composto padrão de referência, sendo os resultados expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG), normalmente mg/L (Magalhães *et al.*, 2008; Pekal *et al.*, 2012).

Além de moroso e de determinar apenas antioxidantes hidrofílicos (não sendo aplicável a matrizes e compostos lipofílicos) (Apak *et al.*, 2007; Magalhães *et al.*, 2008), não é um método específico, tendo a desvantagem de determinar também outras substâncias redutoras adicionadas ou naturalmente presentes (Angelo e Jorge, 2007) como açúcares, aminas aromáticas, guanina, compostos de enxofre, ácido ascórbico e outras vitaminas, ácidos orgânicos, iões inorgânicos como Cu (I) e Fe (II), tióis, entre outros (Prior *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2008; Raal *et al.*, 2012).

2.4.2. Procedimento Experimental

O procedimento de determinação de compostos fenólicos totais utilizado foi adaptado a partir de um método já publicado (Koşar *et al.*, 2008), com algumas modificações. Assim, em balões volumétricos de 10 mL, contendo cerca de 6 mL de água ultra-pura, adicionou-se o volume adequado de cada amostra (infusões antes e após digestão e controlo de digestão) e 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu sem diluição. Deixou-se um minuto à temperatura ambiente, adicionou-se 1,5 mL de uma solução de carbonato de sódio a 20% (peso/volume) e perfez-se o volume a 10 mL com água ultra-pura. As misturas assim preparadas foram incubadas durante 2 horas, a 25 °C e no escuro. Findo este tempo, procedeu-se então à medição da absorvância das amostras num espectrofotómetro (SPEKOL 1500) a 765 nm, contra um branco preparado da mesma forma mas substituindo a amostra por água ultra-pura. Todas as amostras foram analisadas em triplicado, tendo a concentração em fenóis totais sido determinada por interpolação de uma recta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de ácido gálico com concentrações entre os 50 e os 500 mg/L. Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por litro de infusão.

2.5. Determinação do Conteúdo em Flavonóides Totais

2.5.1. Princípio do Método

A quantificação dos flavonóides totais está assente no facto de, em meio alcoólico, ocorrer a formação de complexos estáveis entre o alumínio e os flavonóides, o que origina um desvio para comprimentos de onda mais elevados do máximo de absorção destes compostos. Assim, é possível avaliar a quantidade de flavonóides presentes na amostra em estudo, sem a interferência de outros compostos fenólicos, essencialmente dos ácidos fenólicos, que constantemente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais e também formam complexos com o cloreto de alumínio, mas absorvem a comprimentos de onda inferiores (Lianda e Castro, 2008). O método

pode ser pouco exacto, já que o valor de flavonóides totais determinado pode ser diferente (normalmente inferior) do valor real presente na amostra em estudo. O valor obtido e o real são tanto mais próximos quanto maior a proporção de flavonóis da amostra, devido ao facto de o comprimento de onda utilizado, ou seja, 425 nm, corresponder ao máximo de absorção do complexo quercetina-alumínio. Sendo assim, os complexos de flavanonas e flavanóis com o alumínio, que absorvem na gama entre 310 e 320 nm, não contribuem para a absorvância a 425 nm (Popova *et al.*, 2004).

2.5.2. Procedimento Experimental

O procedimento de determinação dos flavonóides totais utilizado foi adaptado a partir de um método já publicado (Popova *et al.*, 2004), com algumas modificações. Assim, misturou-se em balões de 10 mL, 1000 µL de amostra (infusões antes e após digestão e controlo de digestão), com 400 µL de uma solução 20 g/L de cloreto de alumínio em etanol e 500 µL de ácido acético e completou-se o volume com etanol. Para todas as amostras foram preparados os respectivos brancos, sem adição de cloreto de alumínio. Após um período de incubação de 40 minutos, no escuro e à temperatura ambiente, efectuou-se a leitura da absorvância, a 425 nm (espectrofotómetro SPEKOL 1500), de todas as amostras contra o respectivo branco. A concentração de flavonóides foi determinada por interpolação de uma recta de calibração elaborada como descrito anteriormente, mas substituindo as amostras por soluções alcoólicas de quercetina, com concentrações entre 1 e os 10 mg/L (concentrações finais). Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de quercetina (EQ) por litro de infusão.

2.6. Determinação da Capacidade Antioxidante

2.6.1. Avaliação da capacidade de redução do Cu (II) pelo ensaio CUPRAC

2.6.1.1. Princípio do Método

O método CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*) consiste na redução do Cu (II) para Cu (I) através da acção de antioxidantes redutores (mecanismo SET), presentes numa amostra. Esta reacção origina um complexo Cu-neocuproína (Cu(I)-neocuproína) na forma reduzida, que apresenta uma coloração intensa com um máximo de absorção a 450 nm. Como tal, a redução da forma oxidada do complexo referido pelos componentes da amostra é determinada espectrofotometricamente mediante a leitura da absorvância a 450 nm (Apak *et al.*, 2004). Este método é simples, barato, rápido, reproduzível e sem necessidade de aparelhos muito sofisticados (Apak *et al.*, 2004; Apak *et al.*, 2007). A reacção ocorre em meio neutro, obtido pela adição de tampão de acetato de amónio. O ácido ascórbico é utilizado como composto padrão de referência,

sendo os resultados expressos em equivalentes de ácido ascórbico (EAA), normalmente $\mu\text{mol/g}$ de amostra (Apak *et al.*, 2004).

A neocuproína tem uma limitada solubilidade em água, sendo dissolvida e diluída apenas em solventes orgânicos (Prior *et al.*, 2005) mas o complexo formado é solúvel tanto em meio aquoso como orgânico, tornando este ensaio capaz de quantificar antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos (Apak *et al.*, 2007). A reacção decorre a pH próximo do fisiológico e é relativamente insensível aos factores luz, ar, humidade e pH. O método consegue detectar antioxidantes do tipo tiol (como a glutatona, a cisteína, entre outros) e o cobre tem um potencial de oxidação-redução inferior ao do ferro, metal também utilizado em ensaios que avaliam a capacidade antioxidante pela capacidade redutora, permitindo que as suas reacções sejam mais selectivas, ou seja, possibilitando que interferências comuns, como é o caso das de substratos oxidáveis como açúcares e ácido cítrico, não sejam oxidadas neste ensaio (Apak *et al.*, 2004; Prior *et al.*, 2005).

2.6.1.2. Procedimento Experimental

O procedimento do ensaio CUPRAC foi adaptado a partir de um método já publicado (Apak *et al.*, 2004), com algumas modificações. Para tal, adicionaram-se em tubos de ensaio, 1 mL de cada uma das seguintes soluções: cloreto de cobre (II) bihidratado (10 mM), acetato de amónio (1 M) e neocuproína (7,5 mM em etanol 96%). Ao mesmo tubo adicionaram-se de seguida os volumes adequados (entre 7,5 e 15 μL) de cada uma das amostras antes e após digestão, bem como do controlo de digestão, perfazendo com água ultra-pura para se obter um volume final de 4,1 mL. Após incubação de uma hora à temperatura ambiente e no escuro, efectuou-se a leitura da absorvância das amostras a 450nm (espectrofotómetro SPEKOL 1500), utilizando como branco a mesma mistura mas substituindo a amostra por igual volume de água. As amostras foram analisadas em triplicado tendo a actividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma recta de calibração, preparada da forma já descrita, mas substituindo apenas as amostras por 1,1 mL das soluções padrão de ácido ascórbico (15,625; 31,25; 62,5; 125; e 250 μM). Os resultados foram expressos em μmol de equivalentes de ácido ascórbico (EAA) por litro de infusão.

2.6.2. Avaliação da Capacidade de Quelação do Fe (II)

2.6.2.1. Princípio do Método

A determinação da capacidade quelante das amostras em estudo foi realizada através do ensaio da capacidade de quelação do Fe (II), um método baseado na prevenção da formação de ROS – por intervenção do ferro na reacção de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\bullet + \text{HO}^-$) (Ferreira e Matsubara, 1997; Magalhães *et al.*, 2008) ou pelo seu papel catalisador na reacção de Haber-Weiss ($\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Fe}} \text{HO}^\bullet + \text{HO}^- + \text{O}_2$) (Ferreira e Matsubara, 1997) – através da acção

combinada de todos os agentes quelantes presentes na amostra em estudo. Esta capacidade pode ser detectada com o auxílio da ferrozina (sal dissódico de ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil1,2,4-triazina4',4''-dissulfónico), um agente cromogénico que complexado com o Fe (II) gera a $[\text{Fe}(\text{ferrozina})_3]^{4-}$ e apresenta uma coloração rósea, que absorve a um máximo de 562 nm e cuja intensidade depende da quantidade de Fe (II) disponível em solução. Desta forma, pode determinar-se espectrofotometricamente a quelação efectuada pelos agentes quelantes existentes na amostra, pois o valor de absorvância é inversamente proporcional à taxa de quelação do Fe (II) e, consequentemente, à capacidade antioxidante da amostra (Geckil *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2010). O solvente da reacção é a água ultra-pura. O EDTA é utilizado como composto padrão de referência, sendo os resultados expressos em equivalentes de EDTA (EEDTA), normalmente em mM (Geckil *et al.*, 2005).

2.6.2.2. Procedimento Experimental

O procedimento de determinação da capacidade quelante do Fe (II) utilizado foi adaptado a partir de um método já publicado (Geckil *et al.*, 2005), com algumas modificações. Assim, adicionou-se num microtubo 75 µL de cada uma das amostras a analisar (infusões antes e após digestão e controlo da digestão) e 40 µL de solução de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 mM), seguindo-se uma incubação de cinco minutos à temperatura ambiente. Findo este tempo, adicionaram-se 80 µL de solução de ferrozina (5 mM), perfazendo-se o volume a 800 µL com água ultra-pura. O controlo negativo e os controlos de interferência para cada amostra analisada foram preparados da mesma forma, no entanto no primeiro substituiu-se o volume de amostra por igual volume de água ultra-pura, enquanto no segundo se substituiu o volume de reagentes ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e ferrozina) por igual volume de água ultra-pura. Após agitação vigorosa, procedeu-se a uma nova incubação durante dez minutos à temperatura ambiente no escuro e, findo esse tempo, procedeu-se à leitura das respectivas absorvâncias em espectrofotómetro (SPEKOL 1500) a 562 nm, contra água ultra-pura. Todas as amostras foram analisadas em triplicado e a capacidade antioxidante por quelação do Fe (II) das mesmas foi determinada por interpolação de uma curva de dose-resposta construída com soluções-padrão de EDTA em água (concentrações finais de 0 a 2 mM), preparadas e analisadas de acordo com o mesmo protocolo aplicado às amostras, apenas substituindo o volume de amostra por 75 µL de EDTA da concentração correspondente e após calculada a percentagem de inibição da formação dos complexos $[\text{Fe}(\text{ferrozina})_3]^{4-}$, dada pela equação:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{[(\text{Abs}_{\text{controlo negativo}}) - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{controlo interferência}})]}{(\text{Abs}_{\text{controlo negativo}})} \times 100$$

2.6.3. Capacidade de Sequestro do Radical Anião Superóxido

2.6.3.1. Princípio do Método

A determinação da capacidade antioxidante das amostras em estudo em função do sequestro de $O_2^{\cdot-}$ foi realizada através do método colorimétrico de diminuição da formação de formazano, um método operacionalmente moroso mas bastante sensível e com grande importância biológica, uma vez que o radical anião superóxido pode formar-se *in vivo* no decurso dos processos metabólicos (Magalhães *et al.*, 2008).

O radical anião superóxido reage com o NBT^{2+} , reduzindo-o a formazano (Figura 2.3). Este composto apresenta uma coloração azul, com um máximo de absorção a 560 nm. Assim, qualquer molécula com a capacidade de sequestrar o radical superóxido origina uma diminuição da velocidade de redução do NBT^{2+} , que se traduz por uma diminuição da taxa de aumento da absorvância a 560 nm (Valentão *et al.*, 2001). Neste ensaio, o radical anião superóxido foi gerado pelo sistema PMS e pelo NADH: o PMS, após ter sido reduzido pelo NADH, reage com o oxigénio, produzindo o radical do anião superóxido (Nakamura *et al.*, 1992). A reacção ocorre em meio neutro, obtido pela adição de tampão de fosfatos (Valentão *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2010). O ácido gálico é utilizado como controlo positivo de referência, sendo os resultados normalmente expressos em termos de Cl_{50} , a concentração responsável por 50% de inibição da redução do NBT^{2+} (Valentão *et al.*, 2001).

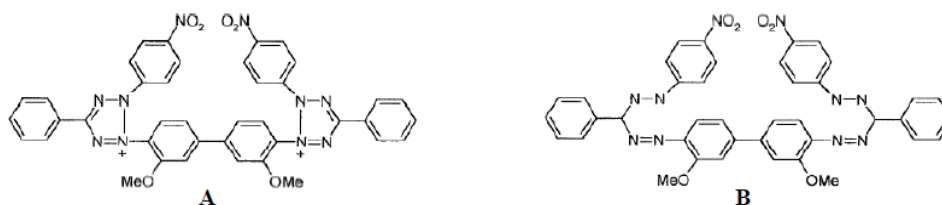


Figura 2.3 – Estrutura do (A) NBT^{2+} e do (B) formazano (Valentão *et al.*, 2001).

2.6.3.2. Procedimento Experimental

O procedimento de determinação da capacidade sequestrante de $O_2^{\cdot-}$ pela diminuição da formação de formazano foi adaptado a partir métodos já publicados (Nakamura *et al.*, 1992; Valentão *et al.*, 2001), com algumas modificações. Sendo assim, adicionaram-se em cuvetes de espectrofotómetro diferentes volumes das amostras (infusões antes e após digestão e controlo da digestão) ou das suas diluições, de modo a testar diferentes concentrações, completando-se posteriormente com água ultra-pura, até 200 μ L. Seguidamente, adicionaram-se 300 μ L de NADH 1,66 mM em tampão de fosfatos (19 mM, pH 7,4), 300 μ L de NBT^{2+} 430 μ M em tampão de fosfatos (19 mM, pH 7,4) e tampão de fosfatos (19 mM, pH 7,4) a fim de se completar o volume a 2 950 μ L. A reacção iniciou-se com a adição de 50 μ L de PMS 162 μ M em tampão de fosfatos (19

mM, pH 7,4) acompanhando-se a variação da absorvância a 560 nm durante dois minutos à temperatura ambiente. Realizou-se, igualmente, um ensaio controlo substituindo a amostra por igual volume de solvente da amostra (água ultra-pura). As determinações foram realizadas em triplicado, num espectrofotómetro (SPEKOL 1500). A percentagem de inibição da redução do NBT^{2+} de cada uma das concentrações das amostras foi calculada em relação ao controlo recorrendo à seguinte expressão:

$$\% \text{Inibição} = [(\text{Variação}_{\text{absorvância do controlo}} - \text{Variação}_{\text{absorvância da amostra}}) / (\text{Variação}_{\text{absorvância do controlo}})] \times 100$$

Por fim, foram construídas curvas de percentagem de inibição *versus* percentagem de amostra, de forma determinar a percentagem de infusão que provocou 50% de inibição da redução do NBT^{2+} , ou seja, o valor de CI_{50} .

2.6.4. Capacidade de Sequestro do Radical Hidroxilo

2.6.4.1. Princípio do Método

A determinação da capacidade antioxidante das amostras em estudo em função do sequestro de HO^{\bullet} foi realizada através do método colorimétrico da degradação da desoxirribose, um método pouco selectivo mas simples, barato e com alguma importância biológica (Magalhães *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2010; Chobot, 2010), cujo mecanismo básico consiste numa reacção em que o HO^{\bullet} produzido pelo sistema de Fenton (Figura 2.4) é capaz de degradar a desoxirribose, formando-se uma mistura de diversos produtos fragmentados. Com um aumento de temperatura, estes originam malonildialdeído (MDA) que por sua vez reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), originando um composto cromogénico (MDA-TBA) de coloração rosa que possui um máximo de absorção a um comprimento de onda de 532 nm (Figura 2.5). Assim, é possível a quantificação indirecta das substâncias degradativas através da determinação da absorvância a este comprimento de onda, sendo a intensidade da coloração desenvolvida proporcional ao MDA-TBA formado (Valentão, 2002; Magalhães *et al.*, 2008; Filgueiras *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2010; Chobot, 2010). Qualquer molécula capaz de sequestrar HO^{\bullet} ou prevenir a sua formação por desactivação da molécula de H_2O_2 (transformando-a em H_2O) irá conduzir a uma diminuição da formação do MDA-TBA, visto que, à medida que são formados, os radicais são imediatamente neutralizados, pois existe uma competição entre a desoxirribose e os antioxidantes existentes no meio reaccional, podendo assim determinar-se espectrofotometricamente a neutralização efectuada pelos compostos sequestrantes existentes na amostra, sendo o valor de absorvância inversamente proporcional à taxa de sequestro do HO^{\bullet} e, consequentemente, à capacidade antioxidante da amostra (Magalhães *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2010; Chobot, 2010). A reacção ocorre em meio ácido, obtido pela adição de ácido tricloroacético (Chobot, 2010). Os resultados

são normalmente expressos em termos de Cl_{50} , que evidencia a concentração responsável por 50% da inibição da degradação da desoxirribose (Filgueiras *et al.*, 2009).

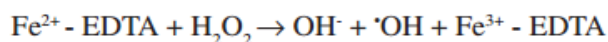
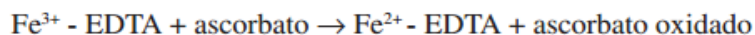


Figura 2.4 – Sistema de Fenton, evidenciando as reacções necessárias à formação do radical hidroxilo (Filgueiras *et al.*, 2009).

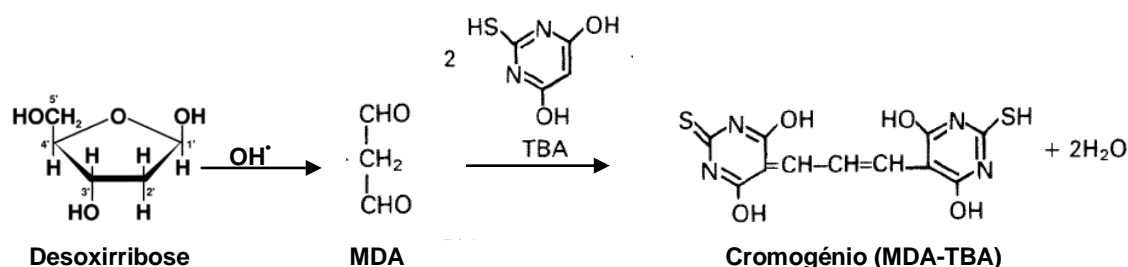


Figura 2.5 – Reacções de formação do composto MDA-TBA (adaptado de Chobot, 2010).

A formação do complexo Fe-EDTA evita a formação de complexos entre o ferro e as substâncias presentes nas misturas de ensaio, a desoxirribose ou o ácido ascórbico, não impedindo a participação do ferro na reacção de Fenton (Chobot, 2010). Quando o ensaio é realizado na ausência de EDTA a desoxirribose pode quelar o Fe (III) o que origina uma maior degradação desta molécula, devido à síntese *site specific* dos radicais hidroxilo (Chobot, 2010).

2.6.4.2. Procedimento Experimental

O procedimento de determinação da capacidade sequestrante de HO^\cdot pela diminuição da degradação da desoxirribose foi adaptado a partir de um método já publicado (Chobot, 2010), com algumas modificações. As determinações foram efectuadas em triplicado, num espectrofotómetro (SPEKOL 1500), a 532 nm. Num tubo de ensaio adicionou-se pela seguinte ordem: 690 μ L de tampão de fosfatos de potássio (15 mM, pH 7,4), 100 μ L de amostra, 100 μ L de desoxirribose (28 mM), 50 μ L de H_2O_2 (28,4 mM), 50 μ L de solução de $FeCl_3/EDTA$ ($FeCl_3$ 400 μ M dissolvido em 2mM de $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$) e por fim, 10 μ L de ácido ascórbico (5 mM), perfazendo, assim, um volume final de 1 mL. Esta mistura reaccional foi incubada a 37 °C durante uma hora, após a qual se adicionou 1 mL de solução de TBA (1% peso/volume em NaOH 50 mM) e 1 mL de ácido tricloroacético (2,8% peso/volume). A solução resultante foi aquecida durante 15 minutos, em

banho de água, a 100 °C. Terminado o tempo de incubação, a amostra foi sujeita a um arrefecimento, com posterior leitura da absorvância a 532 nm. Realizou-se, igualmente, um branco, contendo todos os componentes da mistura reaccional mas substituindo a desoxirribose por igual volume de água, a fim de averiguar a existência de produtos TBA reactivos, provenientes de contaminantes presentes no material ou reagentes. Efectuou-se, identicamente, um controlo positivo, contendo todos os componentes da mistura reaccional mas substituindo a amostra por igual volume de água.

Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da formação de produtos reactivos face ao TBA relativamente ao controlo positivo, calculada recorrendo à seguinte expressão:

$$\% \text{Inibição} = [(\text{Absorvância}_{\text{controlo positivo}} - \text{Absorvância}_{\text{amostra}}) / (\text{Absorvância}_{\text{controlo positivo}})] \times 100$$

2.7. Análise Estatística dos Resultados

O tratamento estatístico dos resultados obtidos ao longo do trabalho experimental elaborado foi efectuado recorrendo à utilização do *software* computacional Microsoft Office Excel 2007® (Microsoft Corporation, Washington). Em todos os testes-*t* elaborados foi utilizado um nível de significância de 0,05.

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

3.1. Preparação das Amostras

Foram preparados 300 mL de infusão e no final do processo o volume obtido foi cerca de dois terços do inicial, devido à evaporação durante a ebulição e, essencialmente, à absorção por parte do material vegetal. Devido ao facto de as infusões sujeitas à simulação da digestão terem sido diluídas durante os processos de acerto de pH e de adição das soluções de enzimas digestivas, as suas concentrações finais em constituintes seriam inferiores às das infusões iniciais. Assim, para que se pudessem comparar entre si as infusões antes e após a digestão *in vitro*, igualaram-se os volumes finais através da adição de água ultra-pura às infusões não digeridas. Além disso, não está garantido que todos os constituintes que se pretendia estudar tenham sido extraídos da planta. Por tais razões, se as determinações efectuadas fossem apresentadas por grama de planta seria incorrecto, tendo-se preferido apresentar os resultados por litro de infusão. Sendo objectivo deste trabalho simular o que ocorre no quotidiano dos consumidores de infusões (que certamente não extrairão o total fenólico das infusões que ingerem), a apresentação dos resultados nestes termos será a mais indicada. As infusões finais, mantidas no escuro e a baixas temperaturas, foram separadas em alíquotas para que se pudesse retirar apenas o volume necessário para cada ensaio, sendo sempre evitado o contacto das mesmas com a luz, oxigénio e temperaturas elevadas.

3.2. Determinação do Conteúdo em Fenólicos Totais

Na determinação dos compostos fenólicos totais através do método de Folin-Ciocalteu, foi possível verificar a ocorrência da reacção de oxidação-redução entre o heteropolianião molibdotungnesteniofosfórico e os iões fenolato (representativos dos fenólicos existentes na amostra) pois as soluções preparadas em balões volumétricos, inicialmente com uma cor amarelada, terminaram o tempo de incubação com uma coloração azul. O coeficiente de determinação ($r^2 = 0,9998$) da curva de calibração evidenciou um bom ajuste dos pontos à mesma, significando que se verificou uma relação linear entre o valor de absorvância das soluções-padrão de ácido gálico a 765 nm após a reacção com o reagente de Folin-Ciocalteu e a sua concentração (em mg/L), que se pode traduzir pela equação $y = 0,1005x + 0,0169$. Tal equação permitiu determinar o teor fenólico das amostras em estudo, expresso em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por litro de infusão.

A análise do teor em compostos fenólicos totais das infusões medicinais (Tabela 3.1, Figura 3.1) permitiu verificar a existência de uma variação significativa no conteúdo fenólico entre as duas infusões, tanto antes como depois da digestão gastrointestinal simulada, tendo as infusões de flor de laranjeira um teor fenólico significativamente mais elevado que o das infusões de flor de camomila. A comparação do teor de fenóis totais das infusões de flor de camomila e laranjeira antes da simulação da digestão gastrointestinal com outros valores publicados na literatura torna-se difícil devido aos procedimentos de preparação das amostras serem bastante variáveis no que

concerne aos solventes utilizados (água, metanol, etanol, misturas de etanol e água, etc.), e ao tempo e temperatura de extração, bem como à forma como se expressam os resultados. No entanto, estudos prévios, em que se comparou o teor em fenóis totais de 70 infusões de ervas diferentes, também mostraram valores relativamente baixos para a infusão de flor de camomila, ficando esta na posição 50 (Katalinic *et al.*, 2006). Esta tendência está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho.

Tabela 3.1 – Conteúdo médio em compostos fenólicos totais das infusões medicinais e do controlo da digestão pelo método de Folin-Ciocalteu.

Amostra	Fenólicos Totais (mg EAG/L de infusão)	
	Não digerida	Digerida
Flor de camomila	549 ^a ± 22	531 ^a ± 18
Flor de laranjeira	911 ^b ± 35	876 ^b ± 49
Controlo da digestão	-	11 ^c ± 1

Valores com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste-*t* ($p < 0,05$).

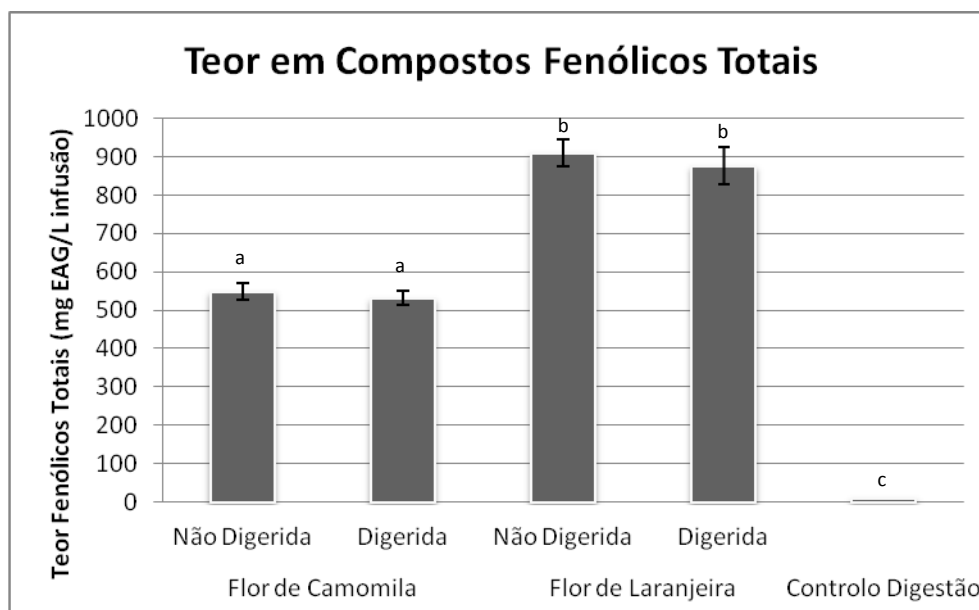


Figura 3.1 – Conteúdo médio em compostos fenólicos totais das infusões medicinais e do controlo da digestão, valores com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste-*t* ($p < 0,05$).

Em relação ao controlo da digestão, os resultados mostraram a existência, nas soluções enzimáticas utilizadas, de compostos capazes de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu, no entanto o resultado é baixo quando comparado com o das infusões e, deste modo, pode considerar-se

esta interferência negligenciável. Os resultados obtidos mostram que a simulação da digestão gastrointestinal não parece exercer nenhum efeito sobre as infusões das duas plantas em estudo, pois estes valores não variaram de forma significativa antes e após a digestão *in vitro* das duas infusões (Tabela 3.1, Figura 3.1). Estudos efectuados a outras infusões aquosas mostraram resultados diferentes, verificando-se um decréscimo do teor em compostos fenólicos totais após digestão simulada (Bermúdez-Soto *et al.*, 2007; Siracusa *et al.*, 2011). No entanto, outros autores, estudando outros tipos de infusões de plantas, evidenciaram que, dependendo da sua estrutura, existem compostos fenólicos sensíveis à digestão *in vitro* enquanto outros não são afectados por este processo (Record e Lane, 2001; Porfírio *et al.*, 2010; Gião *et al.*, 2012). Os resultados sugerem assim que os principais compostos fenólicos presentes nas infusões de flor de camomila e de laranjeira sejam resistentes à digestão gastrointestinal ou, pelo menos, que a sua capacidade para reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu não se altera com este processo.

3.3. Determinação do Conteúdo em Flavonóides Totais

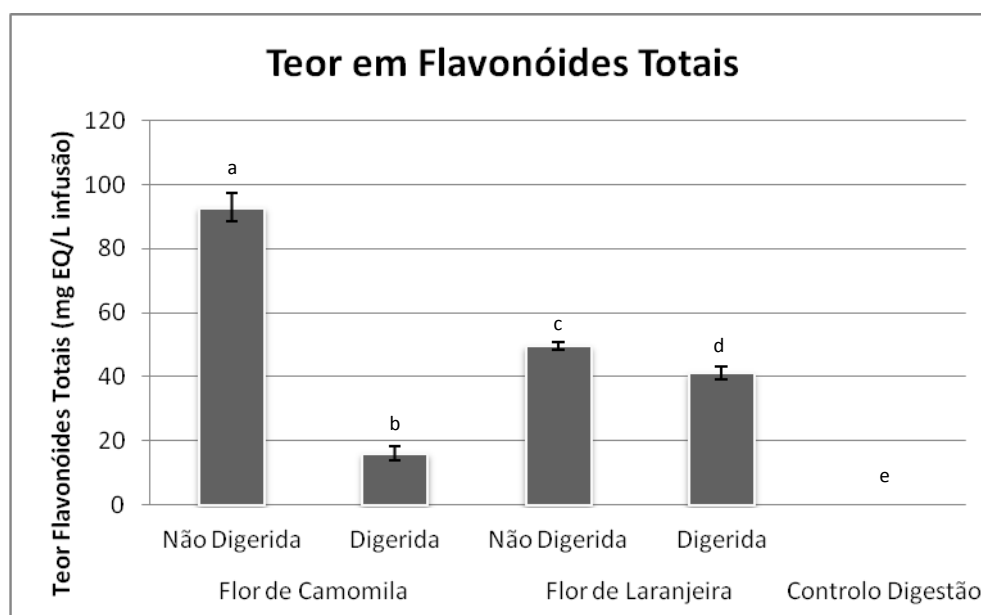
O coeficiente de determinação ($r^2 = 0,9992$) da curva de calibração evidenciou um bom ajuste dos pontos à mesma, significando que se verificou uma relação linear entre o valor de absorvância das soluções-padrão de quercetina a 425 nm após a reacção com o catião de alumínio e a sua concentração (em mg/L), que se pode traduzir pela equação $y = 0,0597x + 0,0074$. Tal equação permitiu determinar o teor em flavonóides das amostras em estudo, expresso em mg de equivalentes de quercetina (EQ) por litro de infusão.

A análise do teor em flavonóides totais das infusões medicinais antes da digestão (Tabela 3.2, Figura 3.2), permitiu verificar que a infusão de flor de camomila é significativamente mais rica em flavonóides que a infusão de flor de laranjeira. Relativamente à amostra de controlo da digestão, os seus valores de absorvância ficaram bastante abaixo dos valores correspondentes à primeira solução-padrão da curva linear de calibração, significando que a solução não possui compostos interferentes com o método em questão, podendo os seus valores ser desprezados. Ao contrário do que se verificou com os compostos fenólicos totais, no caso dos flavonóides verificou-se um decréscimo após a simulação da digestão, apresentando as amostras digeridas teores, nestes compostos, significativamente inferiores aos das amostras não digeridas. Este decréscimo foi consideravelmente mais acentuado na infusão de flor de camomila, onde o teor em flavonóides totais sofreu uma redução de cerca de 83%, do que na de flor de laranjeira, onde este valor se reduziu em cerca de 17%. O decréscimo verificado no teor em flavonóides totais das amostras, em especial para a amostra de flor de camomila, que se verificou após digestão simulada pode significar que a digestão *in vitro* influenciou de algum modo a quantidade de flavonóides presente na amostra, tendo também sido evidenciado semelhante caso no conteúdo em catequinas do chá verde pela sua sensibilidade às condições típicas do intestino (Green *et al.*, 2007).

Tabela 3.2 – Conteúdo médio em flavonóides totais das infusões medicinais e do controlo da digestão.

Amostra	Flavonóides Totais (mg EQ/L de infusão)	
	Não digerida	Digerida
Flor de camomila	92,91 ^a ± 4,29	16,15 ^b ± 2,19
Flor de laranjeira	49,61 ^c ± 1,20	41,23 ^d ± 1,87
Controlo da digestão	-	0,00 ^e ± 0

Valores com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste-*t* ($p < 0,05$).

**Figura 3.2** – Conteúdo médio em flavonóides totais das infusões medicinais e do controlo da digestão, valores com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste-*t* ($p < 0,05$).

Na infusão de flor de camomila, o decréscimo flavonólico sem perda de conteúdo fenólico e, como posteriormente se confirmará, capacidade antioxidante sugere que os flavonóides existentes sejam mais sensíveis que os da outra infusão (por diferenças estruturais) e, em contacto com as condições físicas e químicas da digestão, tenham sido transformados noutros produtos que, apesar de continuarem a ser identificados pelo ensaio de Folin-Ciocalteu, não o são pelo ensaio de complexação do alumínio, o que não implica que tenham perdido a sua capacidade antioxidante e que tenham deixado de estar biodisponíveis (Green *et al.*, 2007).

Sabendo que uma das limitações do ensaio do $AlCl_3$ é a subestimativa nas determinações de amostras ricas em flavanonas, que complexadas não contribuem para os valores de absorvância determinados a 425 nm (Popova *et al.*, 2004; Apak *et al.*, 2007), e considerando que os flavonóides da infusão de flor de laranjeira são maioritariamente flavanonas glicosiladas (naringina, hesperidina e neo-hesperidina) (Castillo *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 2010; Hosseini *et al.*,

2011), enquanto no caso da infusão de flor de camomila são flavonóis e flavonas (McKay e Blumberg, 2006; Harbourne *et al.*, 2009; Nováková *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011; Raal *et al.*, 2012), é possível que a estimativa dos teores seja mais real no caso desta última infusão do que no da primeira. Visto nenhum método colorimétrico conseguir detectar simultaneamente todos os tipos de flavonóides (o ensaio do AlCl_3 apenas detecta flavonóis e flavonas), seria uma mais-valia ter efectuado um ensaio em que se recorre ao reagente de Brady (2,4-dinitrofenilhidrazina), que reage melhor com flavanonas e flavanonóis, somando-se depois os resultados de cada ensaio para obter o conteúdo flavonólico total da amostra (Chang *et al.*, 2002).

Com o objectivo de tentar estabelecer alguma relação entre a constituição fenólica e flavonólica das amostras em estudo determinou-se a razão entre os teores das diversas amostras relativamente aos parâmetros enunciados (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 – Relação entre o teor em flavonóides e compostos fenólicos totais das infusões medicinais.

Amostra	Razão Flavonóides/Fenóis Totais (%)	
	Não digerida	Digerida
Flor de camomila	17	3
Flor de laranja	5	5

A infusão de flor de camomila não digerida, com um conteúdo fenólico total baixo, contém um conteúdo em flavonóides mais alto que o da infusão de flor de laranja, que por seu lado tem um conteúdo fenólico total mais elevado. Desta forma, é possível verificar que os flavonóides contribuem mais fortemente para a composição fenólica total da infusão de camomila, representando cerca de 17%, do que da infusão de flor de laranja, onde representam cerca de 5%. Contudo, dada a sensibilidade destes compostos, especialmente dos da infusão de camomila às condições gastrointestinais, nas amostras digeridas esta situação acaba por se inverter.

3.4. Determinação da Capacidade Antioxidante

A pesquisa científica ligada aos antioxidantes aumentou consideravelmente nos últimos anos, assim como o número de métodos desenvolvidos que permitem medir a sua actividade. Nos sistemas biológicos existem diversas formas de antioxidantes, assim como de radicais livres e oxidantes, com características físico-químicas diferentes e que podem actuar por diferentes mecanismos consoante o sistema de reacção. Devido a estes factores, nenhum dos ensaios existentes poderá detectar simultaneamente todos os antioxidantes de um sistema complexo. Não havendo nenhum método padrão validado que possa fazer tais determinações com precisão, o ideal nestas situações será conjugar diversos dos métodos existentes, tendo em conta todos os

convenientes e inconvenientes de cada método, de modo a conseguir obter uma informação mais realista da capacidade antioxidante. Assim, a capacidade antioxidante das infusões antes e após simulação da digestão gastrointestinal foi avaliada recorrendo a um ensaio de determinação da capacidade redutora (ensaio CUPRAC), um ensaio de quelação de Fe (II) e dois ensaios de sequestro de duas das principais ROS que podem formar-se *in vivo*: os radicais anião superóxido e hidroxilo.

3.4.1. Avaliação da redução do Cu (II) pelo ensaio CUPRAC

O coeficiente de determinação ($r^2 = 0,9995$) dado pela curva linear de calibração evidenciou um bom ajuste dos pontos à mesma, significando que se verificou uma relação linear entre o valor de absorvância das soluções-padrão de ácido ascórbico a 450 nm após a reacção com os reagentes fornecidos e a sua concentração (em μM), que se pode traduzir pela equação $y = 0,004x + 0,063$. Tal equação permitiu quantificar a capacidade antioxidante das amostras em estudo, expressa em mmol de equivalentes de ácido ascórbico (EAA) por litro de infusão, encontrando-se os resultados obtidos na Tabela 3.4 e Figura 3.3.

Tabela 3.4 – Capacidade antioxidante CUPRAC das infusões medicinais e do controlo da digestão.

Capacidade Antioxidante CUPRAC (mmol EAA/L de infusão)		
Amostra	Não digerida	Digerida
Flor de camomila	5,45 ^a ± 0,05	5,44 ^a ± 0,07
Flor de laranjeira	6,89 ^b ± 0,17	6,33 ^c ± 0,10
Controlo da digestão	-	0,006 ^d ± 0,05

Valores com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste-*t* ($p < 0,05$).

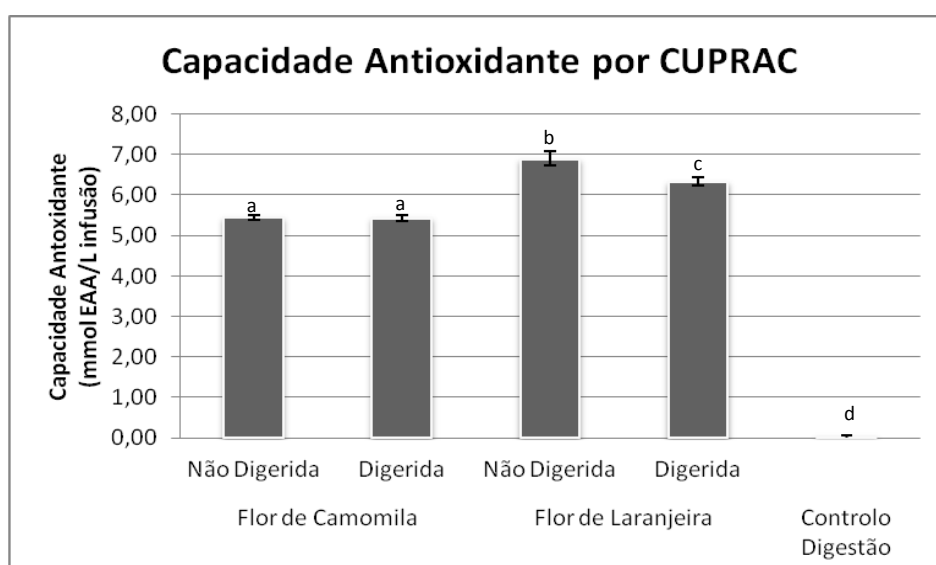


Figura 3.3 – Capacidade antioxidante das infusões e do controlo da digestão determinada pelo ensaio CUPRAC, valores com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste-*t* ($p < 0,05$).

Relativamente à amostra de controlo da digestão, os seus valores de absorvância estão bastante abaixo dos valores correspondentes à primeira solução-padrão da curva linear de calibração, significando que a solução não possui compostos positivamente interferentes com o método em questão, podendo os seus valores ser desprezados.

A análise da capacidade antioxidante das infusões medicinais pelo ensaio CUPRAC (Tabela 3.4, Figura 3.3) permite verificar a existência de diferenças significativas entre as duas infusões, tanto antes como depois da digestão gastrointestinal simulada, tendo ambas as infusões de flor de laranjeira um teor antioxidante mais elevado comparativamente às duas infusões de flor de camomila, respectivamente. Também em relação à forma como a digestão afectou a actividade CUPRAC de ambas as infusões se verificaram comportamentos diferentes. Assim, enquanto os compostos responsáveis pela actividade CUPRAC da infusão de flor de camomila não parecem ter sido afectados pela simulação da digestão, alguns dos compostos responsáveis por esta actividade na infusão de flor de laranjeira terão sido sensíveis à digestão gastrointestinal simulada, o que se evidencia pela diminuição, bastante pequena (8%) mas significativa, no valor de CUPRAC obtido na amostra digerida. Esta diferença, mais uma vez, pode ser explicada pela diferença na constituição fenólica de ambas as infusões.

Estes resultados apresentaram uma tendência concordante com o teor em compostos fenólicos totais das amostras, uma vez que os valores CUPRAC seguiram a mesma ordem verificada no ensaio de Folin-Ciocalteu: flor de laranjeira não digerida > flor de laranjeira digerida > flor de camomila não digerida > flor de camomila digerida. Desta forma, os resultados sugerem que os compostos fenólicos sejam os responsáveis maioritários pela capacidade antioxidante das infusões analisadas detectada pelo ensaio CUPRAC, havendo outros estudos em infusões aquosas que corroboram esta hipótese (Avello *et al.*, 2012; Pekal *et al.*, 2012). No entanto, dentro dos compostos fenólicos, os flavonóides não parecem ser aqueles que mais contribuem para a capacidade antioxidante detectada pelo ensaio CUPRAC, uma vez que a redução significativa que se verifica após digestão da infusão de flor de camomila não é acompanhada por uma redução significativa da actividade CUPRAC.

3.4.2. Determinação da Capacidade de Quelação do Fe (II)

Sabendo que o ferro, um ião metálico de ocorrência biológica, tem efeitos pró-oxidantes na sua forma ferrosa livre (Fe^{2+}) e um papel significativo nas reacções de Fenton e Haber-Weiss, é esperado que origine ROS, havendo no entanto compostos que contrariam essa tendência por se complexarem com o mesmo, através da quelação (Soares *et al.*, 2005), que poderá ser vista como um mecanismo de capacidade antioxidante, visto impedir a participação do Fe (II) nas reacções acima enunciadas (Geckil *et al.*, 2005).

Na determinação da capacidade antioxidante através do ensaio de quelação do Fe (II), efectuou-se uma curva de calibração com o EDTA. O coeficiente de determinação ($r^2 = 0,9888$)

desta evidência um bom ajuste dos pontos à mesma, significando que existe uma relação linear entre o valor de inibição das soluções-padrão de EDTA a 562 nm após a reação com os reagentes fornecidos e a sua concentração (em mM), que se pode traduzir pela equação $y = 874,9x + 4,4631$. Tal equação permitiu quantificar a capacidade antioxidante das amostras em estudo por quelação de Fe (II), expressa em μmol de equivalentes de EDTA (EEDTA) por litro de infusão (Tabela 3.5, Figura 3.4).

Tabela 3.5 – Capacidade quelante média das infusões medicinais e do controlo da digestão determinada pelo ensaio de quelação do Fe (II).

Amostra	Capacidade Quelante Fe (II) (μM EEDTA)	
	Não digerida	Digerida
Flor de camomila	$70,82^a \pm 2,54$	$85,21^b \pm 2,72$
Flor de laranjeira	$43,16^c \pm 2,59$	$90,29^b \pm 3,21$
Controlo da digestão	-	$105,62^d \pm 2,08$

Valores com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste-t ($p < 0,05$).

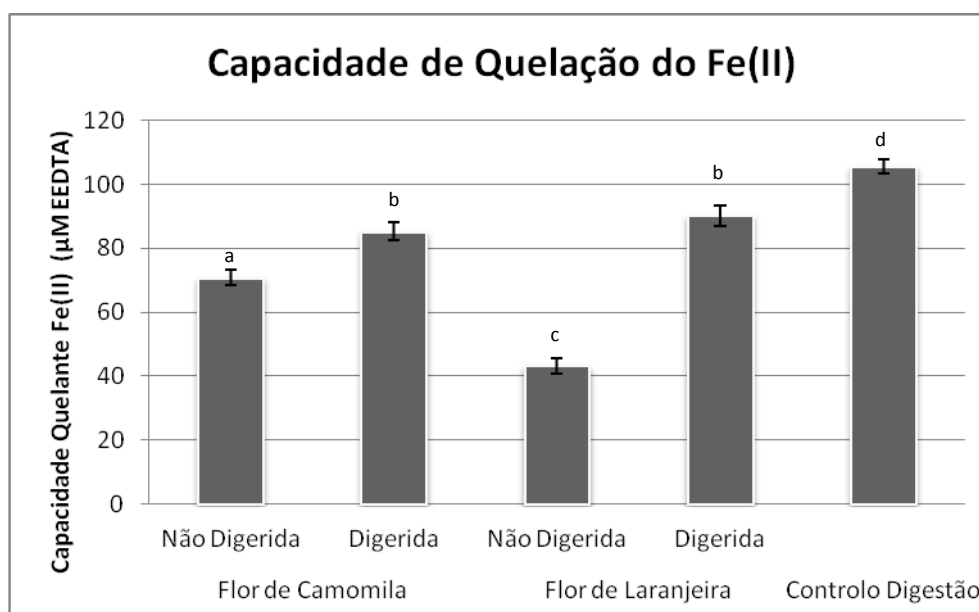


Figura 3.4 – Capacidade de quelação do Fe (II) das infusões medicinais e do controlo da digestão, valores com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste t ($p < 0,05$).

Analisando os dados obtidos (Tabela 3.5, Figura 3.4) é possível verificar que ambas as infusões possuem capacidade quelante de Fe (II), tendo as duas sido capazes de dificultar a formação dos complexos entre o Fe (II) e a ferrozina. Esta capacidade foi, no entanto, significativamente superior na infusão de flor de camomila que na de laranjeira, o que pode sugerir um maior envolvimento dos flavonóides nesta actividade. Neste ensaio verificou-se a existência de

interferência por parte das enzimas utilizadas durante a digestão *in vitro*. Com efeito, o controlo da digestão apresentou uma capacidade de quelação de ferro superior a qualquer uma das amostras, impossibilitando assim a avaliação do efeito da digestão sobre os compostos envolvidos presentes em ambas as infusões neste mecanismo de capacidade antioxidante.

O valor de interferência da amostra no controlo da digestão significa que este possui moléculas com capacidade para efectuar a quelação do Fe (II). Assim, no caso das amostras digeridas, o que se mediu não terá sido apenas a capacidade de quelação dos compostos fenólicos como também de todas as proteínas enzimáticas existentes no meio reaccional. Com o envolvimento das proteínas na formação destes complexos, os compostos fenólicos poderão não desenvolver a sua capacidade antioxidante máxima (Valentão, 2002), o que torna impossível aplicar uma simples subtracção da interferência.

3.4.3. Avaliação da Capacidade de Sequestro do $O_2^{\cdot-}$

Para a determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido das amostras em estudo recorreu-se ao método da inibição da formação de formazano. A capacidade de sequestro do radical anião superóxido foi determinada com diferentes percentagens de amostra na mistura reaccional, de modo a poderem ser construídas curvas de dose-resposta para cada amostra e calculado o respectivo valor de CI_{50} , ou seja a percentagem de amostra na mistura reaccional responsável por 50% de inibição da formação do formazano. O controlo positivo apresentou valores de variação da absorvância dentro do intervalo esperado (dados não mostrados), sendo aquele onde a percentagem de inibição deverá ser máxima (80 a 100%). O estudo dos resultados para o controlo da digestão (dados não mostrados) evidencia que esta não interferiu nos resultados das amostras.

Todas as amostras apresentaram capacidade de sequestrar o radical anião superóxido, uma vez que, em relação ao controlo, todas as amostras conduziram a uma diminuição da velocidade de formação do formazano, resultante da redução do NBT^{2+} pelo radical anião superóxido. Esta actividade é particularmente importante uma vez que *in vivo* ocorre a formação desta espécie radicalar. A percentagem de inibição da formação de formazano aumentou com o aumento da quantidade de amostra presente na mistura reaccional até se atingir um patamar de saturação, que rondou os 50-60% de inibição em todas as amostras, excepto no caso da infusão de flor de camomila não digerida (que foi ligeiramente mais elevada) (Figura 3.5). Os valores de CI_{50} das diferentes amostras para este ensaio encontram-se na Tabela 3.6.

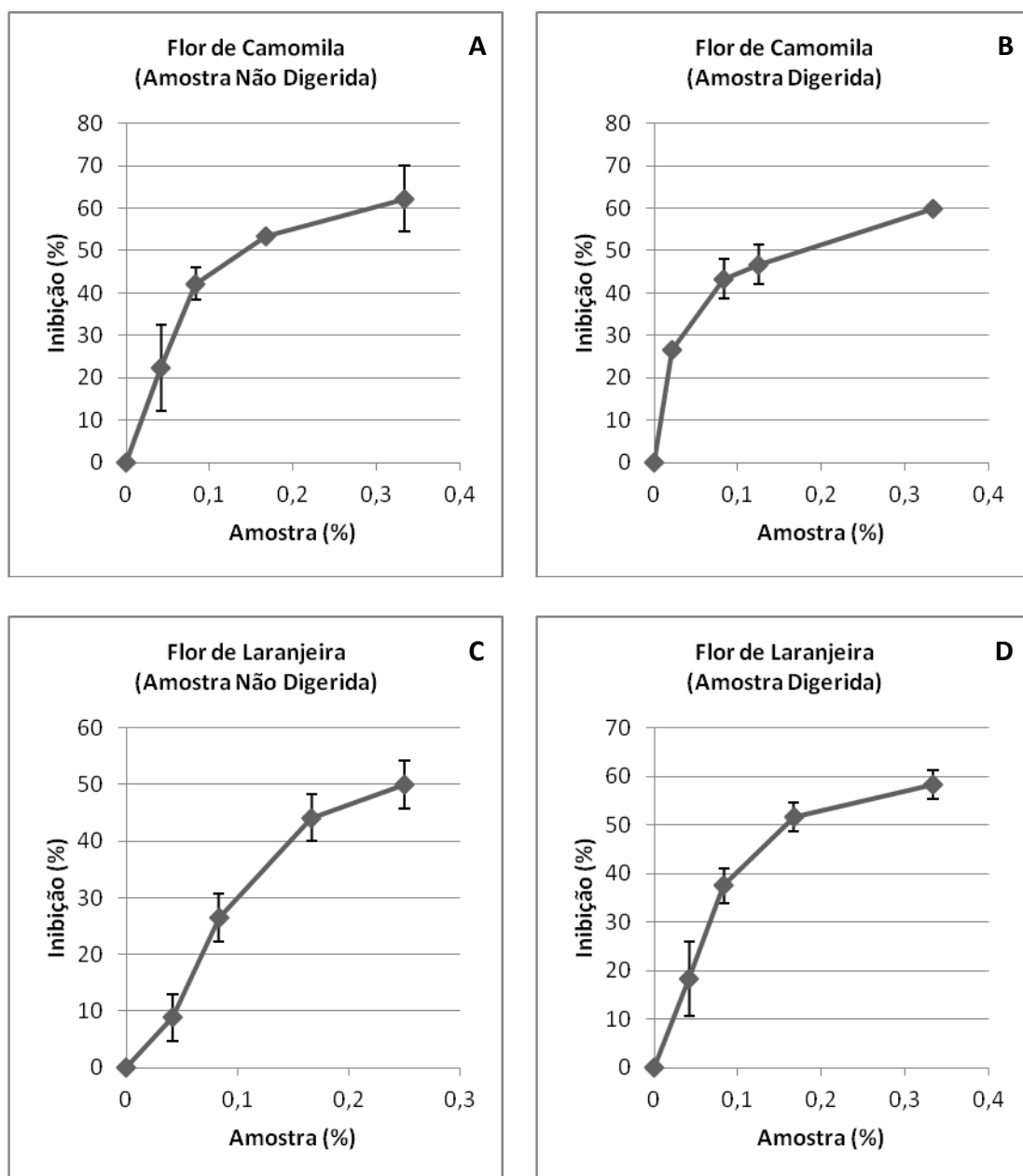


Figura 3.5 – Efeito das infusões de flor de camomila [não digerida (A) e digerida (B)] e de flor de laranjeira [não digerida (C) e digerida (D)] sobre a redução do NBT^{2+} induzida pelo $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Tabela 3.6 – CI_{50} média das infusões medicinais determinada pelo ensaio de sequestro do $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Amostra	CI_{50} no Sequestro de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (% de amostra)	
	Não digerida	Digerida
Flor de camomila	$0,14^a \pm 0,00$	$0,18^b \pm 0,00$
Flor de laranjeira	$0,18^b \pm 0,02$	$0,15^b \pm 0,01$

Valores com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste- t ($p < 0,05$).

A análise dos dados obtidos (Tabela 3.6, Figura 3.5 A-D) possibilitou concluir que ambas as infusões, tanto antes como após digestão, apresentam capacidade de sequestro do radical em questão, pois conduziram a uma satisfatória diminuição da velocidade de formação do composto formazano, o que demonstra que todas as amostras possuem compostos antioxidantes, algo bastante relevante tendo em conta a importância do controlo deste radical nos sistemas fisiológicos.

A análise estatística efectuada realça o facto de todas as amostras serem semelhantes, exceptuando também neste caso a infusão de flor de camomila não digerida, que necessitou de uma quantidade de amostra significativamente inferior para causar 50% de inibição. Comparando esta com a sua amostra digerida (que necessita de uma maior quantidade de amostra para causar o mesmo efeito), não se pôde deixar de notar uma certa relação com o ensaio da determinação do conteúdo em flavonóides totais, em que existia uma diminuição abrupta de conteúdo flavonólico após ter sido efectuada a digestão. Desta forma, é possível que a diminuição da velocidade de reacção com o NBT^{2+} possa estar ligada ao conteúdo flavonólico desta infusão. Quanto à infusão de flor de laranjeira, existe um decréscimo no valor de CI_{50} mas este não é significativo, podendo daqui concluir-se que a capacidade sequestrante testada neste ensaio para esta última infusão não se altera com a digestão.

3.4.4. Avaliação da Capacidade de Sequestro do HO^{\bullet}

Na determinação da capacidade antioxidante das amostras em estudo em função do sequestro de HO^{\bullet} , ensaio com relevância fisiológica devido à possível formação deste radical em organismos aeróbios (incluindo humanos), foi possível verificar em todas as amostras a ocorrência desse mesmo sequestro, com consequente diminuição da formação do composto cromogénico MDA-TBA e correspondente diminuição da intensidade da coloração rósea no final do ensaio. Os resultados foram expressos em termos de percentagem de inibição por sequestro de HO^{\bullet} em relação ao controlo positivo elaborado simultaneamente, tendo os valores do branco do teste sido subtraídos aos valores de absorvância das amostras (Tabela 3.7, Figura 3.6).

Tabela 3.7 – Capacidade sequestrante média das infusões medicinais e do controlo da digestão determinada pelo ensaio de sequestro do HO^{\bullet} .

Amostra	Capacidade Sequestrante HO^{\bullet} (%)	
	Não digerida	Digerida
Flor de camomila	48,17 ^a ± 0,72	69,59 ^b ± 2,32
Flor de laranjeira	49,56 ^a ± 2,45	66,63 ^b ± 3,48
Branco da digestão	-	68,43 ^b ± 1,67

Valores com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste-*t* ($p < 0,05$).

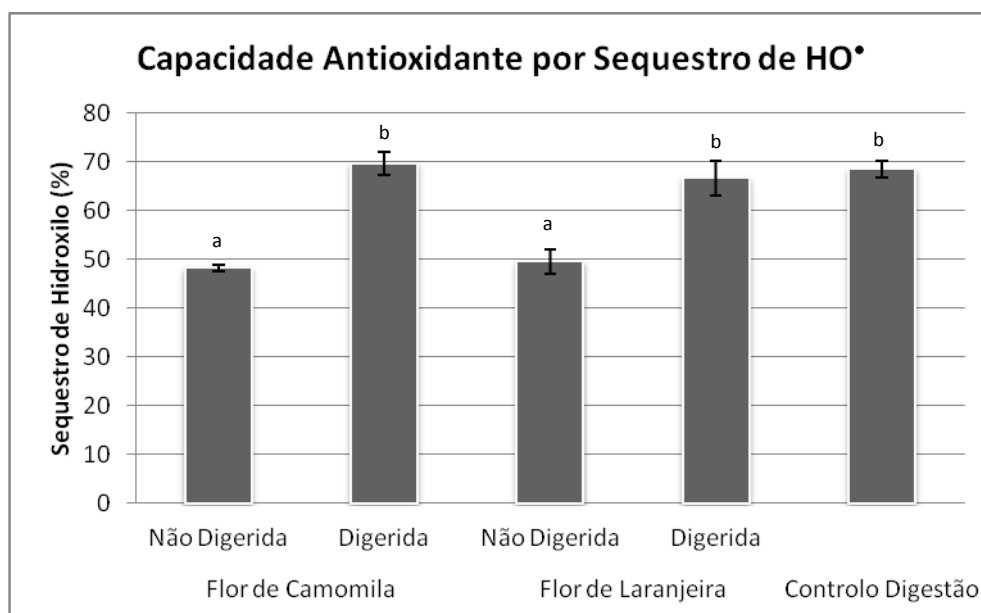


Figura 3.6 – Capacidade de sequestro do HO^\bullet das infusões medicinais e do controlo da digestão, valores com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste- t ($p < 0,05$).

O radical hidroxilo é uma das espécies reactivas de oxigénio mais deletérias, com um tempo de meia-vida muito reduzido (cerca de 10^{-9} segundos nas células) e possui uma elevada reactividade (Filgueiras *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2010), reagindo com proteínas, ADN, ácidos gordos poli-insaturados das membranas e quase todas as moléculas biológicas, para formar espécies radicalares menos reactivas (Filgueiras *et al.*, 2009). Após análise dos resultados apresentados, é possível constatar que tanto a infusão de flor de camomila como a de laranjeira possuem compostos capazes de sequestrar o radical hidroxilo, impedindo, desta forma, a degradação da desoxirribose, não sendo essa capacidade de sequestro significativamente diferente em ambas as infusões. No entanto, também neste ensaio se verificou a existência de interferência por parte das enzimas utilizadas durante a digestão *in vitro*, tendo o controlo da digestão apresentado uma capacidade de sequestro do radical hidroxilo igual à de ambas as infusões após digestão, inviabilizando assim a possibilidade de fazer qualquer distinção ou retirar qualquer conclusão sobre a capacidade sequestrante real das amostras digeridas.

Capítulo 4 – Conclusão

É reconhecido o efeito que a alimentação pode ter sobre a saúde, estimando-se que um grande número de doenças crónicas degenerativas possa ser prevenido, eliminando assim todos os custos a elas associados, fazendo uma dieta rica em vegetais, leguminosas e frutos específicos e evitando, simultaneamente, comportamentos que proporcionem condições para desequilíbrios, como a exposição excessiva a radiações, poluentes ambientais e xenobióticos (Ferreira e Abreu, 2007). De entre os diferentes tipos de compostos naturais, o grupo dos compostos fenólicos é talvez o mais estudado, com actividade antioxidante comprovada em diversos sistemas (Valentão, 2002). São moléculas aromáticas hidroxiladas vulgarmente encontradas em vegetais, frutas e muitas fontes alimentares que constituem uma porção significativa da dieta humana, estando entre as substâncias bioactivas terapeuticamente mais úteis e potentes.

Dentro destes alimentos que têm vindo a ser classificados como podendo contribuir para a promoção da saúde encontram-se as infusões das plantas medicinais. Com efeito, a popularidade destas infusões tem vindo a aumentar ao longo dos tempos, em grande parte devido a serem caracterizadas como bebidas saudáveis, ricas em compostos bioactivos e, por isso, consideradas poderosas aliadas no combate a vários tipos de afecções. Estima-se que muitas das acções terapêuticas exibidas por estas plantas decorram da sua actividade antioxidante mas, geralmente, a sua utilização baseia-se mais no conhecimento tradicional das suas acções. A inexistência de um suporte científico para a actividade que lhes é atribuída levou a que começassem a ser desenvolvidos ensaios biológicos dessas espécies (Valentão, 2002). Contudo, muitos desses estudos baseiam-se na determinação do potencial antioxidante através da realização de ensaios *in vitro*. No entanto, tal potencial só será de alguma utilidade se a biodisponibilidade destes compostos for assegurada, ou seja, se eles resistirem ao processo de digestão gastrointestinal, forem absorvidos pelas células do intestino e não forem rapidamente inactivados, nem pelas bactérias da flora intestinal nem pelas enzimas de biotransformação humanas, podendo ser disponibilizados nos seus tecidos-alvo (Gião *et al.*, 2012). Todos estes factores podem explicar as inconsistências e conflitos que se verificam entre os dados obtidos em ensaios *in vitro* e *in vivo* (Arts *et al.*, 2002). Contudo, mesmo não sendo absorvidos, a existência de compostos antioxidantes, que mantêm esta sua actividade biológica após a digestão gastrointestinal, pode ser benéfica na desactivação de espécies oxidativas que se encontrem ou se formem ao longo do tubo digestivo, impedindo, desta forma, que elas possam vir a exercer os seus efeitos deletérios.

Assim, o principal objectivo deste trabalho foi o de avaliar se as propriedades antioxidantes das infusões de flor de camomila e flor de laranjeira se mantinham após a simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal. A escolha destas duas plantas prendeu-se com o facto de tanto a infusão de flor de camomila como a de flor de laranjeira serem de consumo corrente em Portugal. Estas foram sujeitas a uma simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal, com o objectivo de “mimetizar” o ambiente e processos digestivos sofridos no estômago e intestino delgado humanos, recorrendo-se à utilização de enzimas digestivas e respeitando as condições de pH presentes em cada fase da digestão. Posteriormente, efectuou-se o doseamento dos fenóis e flavonóides nas amostras antes e após digestão *in vitro*. Este doseamento foi efectuado devido a ser conhecida a

importância da presença dos compostos fenólicos e, em particular, flavonóides nas propriedades antioxidantes das infusões. Para a determinação das propriedades antioxidantes das infusões em estudo recorreu-se a diversos ensaios, de forma a abranger vários mecanismos de acção antioxidante. Assim, foram elaborados ensaios de avaliação da capacidade de sequestro de duas das principais espécies reactivas de oxigénio que podem ser geradas *in vivo*, (radical hidroxilo e radical anião superóxido), de avaliação da capacidade redutora (ensaio CUPRAC) e de capacidade de quelação de Fe (II).

Os resultados mostraram que ambas as infusões apresentaram actividade antioxidante em todos os ensaios efectuados, destacando-se a infusão de flor de laranjeira na actividade CUPRAC e a de flor de camomila na capacidade de quelação de Fe (II) e no sequestro do radical anião superóxido. Uma vez que a infusão de flor de camomila apresentou um teor em flavonóides mais elevado do que a infusão de laranjeira, mas um teor em fenóis totais inferior, estes resultados sugerem que, no conjunto dos compostos fenólicos, sejam os flavonóides aqueles que mais contribuem para a quelação de ferro e para o sequestro do radical anião superóxido. No sequestro do radical hidroxilo não se verificaram diferenças entre as duas infusões. Contudo, não se pode descartar a hipótese de os flavonóides presentes em ambas as infusões serem diferentes, sendo os que se encontram presentes na infusão de flor de laranjeira bastante mais activos em termos de capacidade redutora.

Não foi possível avaliar o efeito da digestão gastrointestinal em dois dos ensaios efectuados devido à grande interferência verificada pela presença das enzimas digestivas. Assim, não foi possível avaliar o efeito da digestão sobre a capacidade de sequestro do radical hidroxilo nem sobre a capacidade de quelação de ferro.

Os resultados obtidos permitem concluir que, apesar das diferenças observadas antes e após a simulação da digestão gastrointestinal, de uma maneira geral, a maioria dos compostos responsáveis pelo potencial antioxidante das infusões de flor de camomila e de laranjeira não perde a sua actividade após o processo digestivo. Com efeito, a capacidade antioxidante destas infusões ou não se alterou, caso da infusão de flor de laranjeira no ensaio de sequestro do radical anião superóxido e da infusão de camomila no ensaio CUPRAC, ou diminuiu ligeiramente, caso da infusão de flor de laranjeira no ensaio CUPRAC e da infusão de flor de camomila no ensaio de sequestro do radical anião superóxido. Estes resultados sugerem que, mesmo que se verifiquem alterações estruturais durante o processo de digestão, a actividade dos compostos não é alterada de forma substancial.

A avaliação realizada do efeito da digestão *in vitro* nas propriedades antioxidantes das infusões ficou parcialmente limitada devido às interferências que as enzimas digestivas exerceram nas técnicas analíticas utilizadas. Com efeito, dos quatro ensaios realizados apenas foi possível retirar conclusão de dois. Desta forma, a continuação deste trabalho passaria, numa primeira fase, por descobrir como será possível retirar a interferência causada pelas enzimas digestivas ou procurar ensaios substitutos com o mesmo objectivo mas que não sejam susceptíveis a

interferências deste tipo. Também poderá ser interessante fazer uma correlação entre a capacidade antioxidante e o conteúdo destas plantas em compostos bioactivos específicos, a fim de permitir criar novos remédios naturais para as terapias apropriadas, podendo para isso recorrer-se à técnica de HPLC, que tem a vantagem de fazer a separação e quantificação simultânea dos compostos presentes nas infusões, podendo ao mesmo tempo elucidar sobre o perfil pré- e pós-digestão.

Uma das vertentes inovadoras deste trabalho experimental foi, sem dúvida, a determinação da actividade antioxidante após submeter as amostras a uma digestão *in vitro*, sendo os primeiros resultados que, do nosso conhecimento, se obtiveram para as duas infusões em estudo. No entanto, este estudo é apenas um primeiro passo para conseguir um maior conhecimento sobre as possibilidades de manutenção *in vivo* das propriedades bioactivas verificadas *in vitro*. Assim, para se obter uma determinação mais aproximada da capacidade antioxidante dos compostos *in vivo*, seria de todo o interesse ter-se introduzido o passo da simulação da digestão no cólon, tentando mimetizar a acção da microflora bacteriana natural do intestino e das suas próprias enzimas, visto que estas conseguem realizar determinadas hidrólises que podem não ser efectuadas durante as fases de digestão gástrica e intestinal. Esta poderá ser uma questão importante a investigar, pois os metabolitos resultantes deste processo podem ter impacto na bioacessibilidade, biodisponibilidade e actividade biológica dos compostos fenólicos.

Por outro lado, seria interessante acoplar ao mecanismo de digestão *in vitro* utilizado um modelo de absorção *in vitro* apropriado, como, por exemplo, as células Caco-2, possibilitando, deste modo, uma previsão da biodisponibilidade potencial dos compostos bioactivos. Além disso, a grande parte das evidências que suportam as funções antioxidantes das infusões provêm de ensaios *in vitro*, ao contrário das evidências da existência ou não de propriedades antioxidantes *in vivo*, que são muito mais limitadas, podendo um projecto ambicioso incidir em estudos epidemiológicos, com possibilidade de utilização de biomarcadores, como, por exemplo, a quantificação de bases oxidadas ou de produtos de lipoperoxidação, facultando assim uma tentativa para melhor demonstrar o que realmente acontece no organismo humano.

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

- Adkin, D. A., Davies, S. S., Sparrow, R. A., Huckle, P. D., Phillips, A. J., Wilding, I. R. (1995). The Effect of Different Concentrations of Mannitol in Solution on Small Intestinal Transit: Implications for Drug Absorption. *Pharmaceutical Research*, **12**(3), 393-396.
- Afonso, M. S. (2010). Avaliação do efeito do extrato aquoso e da fração fenólica livre do Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estado antioxidante e o perfil lipídico em ratos com hipercolesterolemia induzida pela dieta. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9132/tde-17012011-163651/pt-br.php>.
- Al-Ismaïl, K. M., Aburjai, T. (2004). Antioxidant activity of water and alcohol extracts of chamomile flowers, anise seeds and dill seeds. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, **84**, 173-178.
- Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Bahia, M. V., Aguiar, R. M. (2010) Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova*, **33**(10), 2202–2210.
- Angelo, P. M., Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, **66**(1), 1-9.
- Anjo, D. F. C. (2004). Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular – Artigo de Revisão. *Jornal Vascular Brasileiro*, **3**(2), 145-154.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**(26), 7970-7981.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., Berker, K. I., Özyurt, D. (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, **12**, 1496-1547.
- Arts, M. J., Haenen, G. R., Wilms, L. C., Beetstra, S. A., Heijnen, C. G., Voss, H.-P., Bast, A. (2002). Interactions between Flavonoids and Proteins: Effect on the Total Antioxidant Capacity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 1184-1187.
- Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, **89**, 27-36.
- Avello, M. A., Pastene, E. R., Bustos, E. D., Bittner, M. L., Becerra, J. A. (2012). Variation in phenolic compounds of *Ugni molinae* populations and their potential use as antioxidant supplement. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000122>.

- Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuño, A., Río, J. A. (1997). Uses and Properties of *Citrus* Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**(12), 4505-4515.
- Bermúdez-Soto, M. J., Tomás-Barberán, F. A., García-Conesa, M. T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, **102**, 865-874.
- Block, G., Patterson, B., Subar, A. (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*, **18**(1), 1-29.
- Bora, K., Miguel, O. G., Andrade, C. A., Oliveira, A. O. T. (2005). Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante de diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (Presl.) Hook, Dicksoniaceae. *Visão Acadêmica*, **6**(2), 6-15.
- Borgström, B., Dahlqvist, A., Lundh, G., Sjövall, J. (1957). Studies of Intestinal Digestion and Absorption in the Human. *Journal of Clinical Investigation*, **36**(10), 1521-1536.
- Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M. L. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, **15**(4), 186-190.
- Castillo, J., Benavente, O., Río, J. A. (1992). Naringin and Neohesperidin Levels during Development of Leaves, Flower Buds, and Fruits of *Citrus aurantium*. *Plant Physiology*, **99**, 67-73.
- Cervellati, R., Renzulli, C., Guerra, M. C., Speroni, E. (2002). Evaluation of Antioxidant Activity of Some Natural Polyphenolic Compounds Using the Briggs-Rauscher Reaction Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 7504-7509.
- Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., Chong, K. L., Tan, J. B. L., Wong, S. K. (2010). Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas. *Journal of Food Composition and Analysis*, **23**, 185-189.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., Chern, J. C. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, **10**(3), 178-182.
- Charlton, A. J., Baxter, N. J., Khan, M. L., Moir, A. J. G., Haslam, E., Davies, A. P., Williamson, M. P. (2002). Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 1593-1601.
- Chobot, V. (2010). Simultaneous Detection of Pro- and Antioxidative Effects in the Variants of the Deoxyribose Degradation Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**(4), 2088-2094.
- Chung, F.-L., Chen, H.-J. C., Nath, R. G. (1996). Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. *Carcinogenesis*, **17**(10), 2105-2111.

- Cilla, A., Perales, S., Lagarda, M. J., Barberá, R., Clemente, G., Farré, R. (2011). Influence of storage and *in vitro* gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity of fruit beverages. *Journal of Food Composition and Analysis*, **24**, 87-94.
- Dinnella, C., Minichino, P., D'Andrea, A. M., Monteleone, E. (2007). Bioaccessibility and Antioxidant Activity Stability of Phenolic Compounds from Extra-Virgin Olive Oils during *in Vitro* Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 8423-8429.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., Mérillon, J.-M. (2009). Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 1768-1774.
- Ferguson, L. R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, **475**, 89-111.
- Ferreira, A. L. A., Matsubara, L. S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, **43(1)**, 61-68.
- Ferreira, I. C. F. R., Abreu, R. M. V. (2007). Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise*, **IV(2)**, 32-39.
- Filgueiras, C. T., Soares, A. L., Shimokomaki, M., Ida, E. I. (2009). Avaliação da Atividade Antioxidante do Ácido Fítico de Germe de Milho. *Química Nova*, **32(7)**, 1787-1791.
- Fugh-Berman, A., Myers, A. (2004). *Citrus aurantium*, an Ingredient of Dietary Supplements Marketed for Weight Loss: Current Status of Clinical and Basic Research. *Experimental Biology and Medicine*, **229**, 698-704.
- Geckil, H., Ates, B., Durmaz, G., Erdogan, S., Yilmaz, I. (2005). Antioxidant, Free Radical Scavenging and Metal Chelating Characteristics of Propolis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, **1(1)**, 27-31.
- Gião, M. S., Gomes, S., Madureira, A. R., Faria, A., Pestana, D., Calhau, C., Pintado, M. E., Azevedo, I., Malcata, F. X. (2012). Effect of *in vitro* digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of *Agrimonia eupatoria*, *Rubus idaeus*, *Salvia* sp. and *Satureja montana*. *Food Chemistry*, **131**, 761-767.
- Giori, F. P. (2010). Adaptação de metodologia de digestão *in vitro* e determinação da bioacessibilidade *in vitro* de β -caroteno em três variedades de batata doce de polpa alaranjada. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, disponível em http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=181869, acedido em Agosto de 2012.

- Green, R. J., Murphy, A. S., Schulz, B., Watkins, B. A., Ferruzzi, M. G. (2007). Common tea formulations modulate *in vitro* digestive recovery of green tea catechins. *Molecular Nutrition & Food Research*, **51**, 1152-1162.
- Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants – *quo vadis?*. *Trends in Pharmacological Sciences*, **32(3)**, 125-130.
- Han, X, Shen, T., Lou, H. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences*, **8**, 950-988.
- Harbourne, N., Jacquier, J. C., O’Riordan, D. (2009). Optimisation of the extraction and processing conditions of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) for incorporation into a beverage. *Food Chemistry*, **115**, 15-19.
- Haslam, E. (1989). Plant polyphenols: vegetable tannins revisited. 1ª Edição, Cambridge University Press, Reino Unido, pp. 7-9.
- Heinrich, H. C., Gabbe, E. E., Brüggeman, J., Icagic, F. (1979). Enteropancreatic Circulation of Trypsin in Man. *Klinische Wochen-schrift*, **57**, 1295-1297.
- Henning, S. M., Fajardo-Lira, C., Lee, H. W., Youssefian, A. A., Go, V. L. W., Heber, D. (2003). Catechin Content of 18 Teas and a Green Tea Extract Supplement Correlates With the Antioxidant Capacity. *Nutrition and Cancer*, **45(2)**, 226-235.
- Hickman, C. P., Roberts, L. S., Larson, A., Anson, H., Eisenhour, D. (2006). *Integrated Principles of Zoology*. 13ª Edição, McGraw-Hill Companies, New-York, E.U.A., pp. 58-59, 694-702, 706.
- Horzic, D., Komes, D., Belščak, A., Ganic, K. K., Ivekovic, D., Karlovic, D. (2009). The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*, **115**, 441-448.
- Hosseini, M., Pkan, P., Rakhshandeh, H., Aghaie, A., Sadeghnia, H. R., Rahbardar, M. G. (2011). The Effect of Hydro-Alcoholic Extract of Citrus Flower on Pentylenetetrazole and Maximal Electroshock-Induced Seizures in Mice. *World Applied Sciences Journal*, **15(8)**, 1104-1109.
- Humadi, S. S., Istudor, V. (2008). Quantitative Analysis of Bio-Active Compound in Hibiscus sabdariffa L. Extracts. Quantitative Analysis of Flavonoids. *Farmacia*, **56(6)**, 699-707.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., McClements, D. J. (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, **125**, 1-12.
- Jung, U. J., Lee, M.-K., Park, Y. B., Kang, M. A, Choi, M.-S. (2006). Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2diabetic mice. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **38**, 1134–1145.
- Katalinic, V., Milos M., Kulisic, T., Jukic M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, **94**, 550–557.

- Kohen, R., Nyska, A. (2002). Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, **30**(6), 620-650.
- Koşar, M., Göger, F., Başer, K. H. C. (2008). In Vitro Antioxidant Properties and Phenolic Composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 2369-2374.
- Lamarão, R. C., Fialho, E. (2009). Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. *Revista de Nutrição*, **22**(2), 257-269.
- Landete J. M. (2012). Uptadet Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **52**, 936-948.
- Lianda, R.L.P., Castro, R.N. (2008). Isolamento e identificação da morina em mel brasileiro de *Apis mellifera*. *Química Nova*, **31**(6), 1472-1475
- Liang, L., Wu, X., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Zou, Y., Mao, G., Yang, L. (2012). In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Research International*, **46**, 76-82.
- Lidon, F., Silvestre, M. M. (2010). *Princípios de Alimentação e Nutrição Humana*. 1ª Edição, Escolar Editora, Lisboa, Portugal, pp. 307-323, 528-529, 532.
- Lima, A., Silva, A. M. O., Trindade, R. A., Torres, R. P., Mancini-Filho, J. (2007). Composição Química e Compostos Bioativos Presentes na Polpa e na Amêndoa do Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, **29**(3), 695-698.
- Lima, A., Pereira, R., Abrahão, S. (2010). Compostos bioativos do café: Actividade antioxidante *in vitro* do café verde e torrado antes e após descafeinação. *Química Nova*, **33**(1), 20-24.
- Lu, Y., Zhang, C., Bucheli, P., Wei, D. (2006). Citrus Flavonoids in Fruit and Traditional Chinese Medicinal Food Ingredients in China. *Plant Foods for Human Nutrition*, **61**, 57-65.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, **613**(1), 1-19.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficiency of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **81**(suppl.), 230S-242S.
- Martínez-Flórez S., González-Gallego J., Culebras J. M., Tuñón M. J. (2002). Revisión Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, **6**, 271–278.

- Martins, J. C. (2011). Erva Carqueja – Um chá para todos os males. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Fernando Pessoa do Porto, disponível em <http://bdigital.ufp.pt/handle/10284/2454>.
- McKay, D. L., Blumberg, J. B. (2006). A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Chamomile Tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytotherapy Research*, **20**, 519-530.
- Mencherini, T., Campone, L., Piccinelli, A. L., Mesa, M. G., Sánchez, D. M., Aquino, R. P., Rastrelli, L. (2012). HPLC-PDA-MS and NMR Characterization of a Hydroalcoholic Extract of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Peel with Antiedematogenic Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, DOI: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf302815t>.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, **85**, 231-237.
- Moraes-de-Souza, R. A., Oldoni, T. L. C., Cabral, I. S. R., Alencar, S. M. (2011). Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de chás comercializados no Brasil. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, **29(2)**, 229-236.
- Morais, S. M., Cavalcanti, E. S. B., Costa, S. M. O., Aguiar, L. A. (2009). Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **19(1B)**, 315-320.
- Moreira, A. V., Mancini-Filho, J. (2004). Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. *Revista de Nutrição*, **17(4)**, 411-424.
- Nakamura, S., Kato, A., Kobayashi, K. (1992). Enhanced antioxidative effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40(11)**, 2033-2037.
- Nichenametla, S., Taruscio, T., Barney, D., Exon, J. (2006). A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **46**, 161-183.
- Nováková, L., Vildová, A., Mateus, J. P., Gonçalves, T., Solich, P. (2010). Development and application of UHPLC–MS/MS method for the determination of phenolic compounds in Chamomile flowers and Chamomile tea extracts. *Talanta*, **82**, 1271-1280.
- Papadopoulou, A., Frazier, R. A. (2004). Characterization of protein-polyphenol interactions. *Trends in Food Science & Technology*, **15**, 186-190.
- Pekal, A., Drozd, P., Pyrzynska, K. (2012). Comparison of the Antioxidant Properties of Commonly Consumed Commercial Teas. *International Journal of Food Properties*, **15(5)**, 1101-1109.

- Pereira, R. P., Fachinetto, R., Prestes, A. S., Puntel, R. L., Silva, G. N. S., Heinzmann, B. M., Boschetti, T. K., Athayde, M. L., Bürger, M. E., Morel, A. F., Morsch, V. M., Rocha, J. B. T. (2009). Antioxidant Effects of Different Extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratos*. *Neurochemical Research*, **34**, 973-983.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, **41**, 274-285.
- Petisca, C. I. B. (2008). Quantificação dos Compostos Bioativos em Infusões de Chá Verde dos Açores: Comparação com os Teores Presentes em Bebidas Comerciais com Chá Verde. Trabalho de Investigação da Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, disponível em http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/54767/1/120839_0833TCD33.pdf.
- Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., Bogdanov, S. (2004). Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis*, **15**(4), 235-240.
- Porfírio, S., Falé, P., Madeira, P., Florêncio, M., Ascensão, L., Serralheiro, M. (2010). Antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of *Plectranthus barbatus* tea, after *in vitro* gastrointestinal metabolism. *Food Chemistry*, **122**, 179-18.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(10), 4290-4302.
- Raal, A., Orav, A., Pussa, T., Valner, C., Malmiste, B., Arak, E. (2012). Content of essential oil, terpenoids and polyphenols in comercial chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) teas from different countries. *Food Chemistry*, **131**, 632-638.
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., Kumar, M. N. V. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, **113**, 189–207.
- Record, I. R., Lane, J. M. (2001). Simulated intestinal digestion of green and black teas. *Food Chemistry*, **73**, 481-486.
- Rizea, G. D., Mihele, D., Manea, S., Ionescu, D., Setnic, S., Mazilu, E. (2010). The Content in Free Radical Scavenging Compounds in Plants Used in Cardiovascular Phytotherapy. *Proceeding of the International Conference BIOATLAS 2010 Transilvania University of Brasov, Romania*, 94-100.
- Rodrigues, S. S. P., Trichopoulou, A., Almeida, M. D. V. (2008). Household diet quality in relation to mortality in Portuguese regions: an ecological study. *Journal of Public Health*, **16**(1), 43-51.

- Rothman, S., Liebow, C., Isenman, L. (2002). Conservation of Digestive Enzymes. *Physiological Reviews*, **82**, 1-18.
- Ryan, T. P., Aust, S. D. (1992) The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Critical Reviews in Toxicology*, **22(1)**, 119-141.
- Salah, N., Miller, N. J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. P., rice-Evans, C. (1995). Polyphenolic Flavanols as Scavengers of Aqueous Phase Radicals and as Chain-Breaking Antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **322(2)**, 339-346.
- Seleções Reader's Digest (2006). Os Remédios da Natureza, Segredos e Virtudes das Plantas que Curam. 1ª Edição, Seleções do Reader's Digest, Lisboa, Portugal, pp. 127.
- Serrano, J., Goñi, I., Calixto, F. S. (2007). Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Research International*, **40**, 15-21.
- Singh, O., Khanem, Z., Misra, N., Srivastava, M. K. (2011). Chamomile (*Matricaria recutita* L.): An overview. *Pharmacognosy Reviews*, 5(9), 82-95.
- Singleton, A. O., Rowe, E. B. (1954). Peristalsis in Reversed Loops of Bowel. *Annals of Surgery*, **139(6)**, 853-857.
- Siracusa, L., Kulisic-Bilusic, T., Politeo, O., Krause, I., Dejanovic, B., Ruberto, G. (2011). Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Aqueous Infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after Submission to a Two-Step *in Vitro* Digestion Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 12453-12459.
- Soares, J. M., Oliveira, M. G. A., Dozele, J. L., Moraes, J. H. K. (1999). Actividade Enzimática da Tripsina e Quimotripsina do Pâncreas e do Quimo de Leitões do Nascimento aos 35 dias de idade. *Revista Ceres*, **46(264)**, 125-139.
- Soares, D. G., Andreazza, A. C., Salvador, M. (2005). Avaliação de compostos com actividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(1), 95-100.
- Srivastava, J. K., Gupta, S. (2009). Extraction, Characterization, Stability and Biological Activity of Flavonoids Isolated from Chamomile Flowers. *Molecular & Cellular Pharmacology*, **1(3)**, 138-147.
- Srivastava, J. K., Shankar, E., Gupta, S. (2010). Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. *Molecular Medicine Reports*, **3(6)**, 895-901.
- Stevenson, D. E., Hurst, R. D. (2007). Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more?. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **64**, 2900-2916.

- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Bastos, M. L. (2001). Antioxidant Activity of *Centaurium erythraea* Infusion Evidenced by Its Superoxide Radical Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibitory Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49(7)**, 3476-3479.
- Valentão, P. C. R. (2002). Limonete, Hipericão-do-Gerês, Cardo-do-Coalho, Fel-da-Terra – Metodologias de controlo de qualidade com base na fracção fenólica; Estudos de acção antioxidante e hepatoprotectora. Dissertação de Doutoramento apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, disponível em <http://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/9820>.
- Vallejo, F., Gil-Izquierdo, A., Pérez-Vicente, A., García-Viguera, C. (2004). In Vitro Gastrointestinal Digestion Study of Broccoli Inflorescence Phenolic Compounds, Glucosinates, and Vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 135-138.
- Wilfart, A., Jaguelin-Peyraud, Y., Simmins H., Noblet, J., Milgen, J., Montagne, L. (2008). Kinetics of enzymatic digestion of feeds as estimated by a stepwise *in vitro* method. *Animal Feed Science and Technology*, **141**, 171-183.
- Wootton-Beard, P. C., Moran, A., Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International*, **44**, 217-224.
- Yang, L., Cao, Y.-L., Jiang, J.-G., Lin, Q.-S., Chen, J., Zhu, L. (2010). Response surface optimization of ultrasound-assisted flavonoids extraction from the flower of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. *Journal of Separation Science*, **33**, 1349-1355.
- Zhang, J., Wang, J., Brodbelt, J. (2005). Characterization of flavonoids by aluminum complexation and collisionally activated dissociation. *Journal of Mass Spectrometry*, **40(3)**, 350-363.
- Zhao, H. Y., Yang, L., Wei, J., Huang, M., Jiang, J.G. (2012). Bioactivity evaluations of ingredients extracted from the flowers of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. *Food Chemistry*, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.018>.